



Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Molecular

**Análisis estructura-función de la DNA polimerasa λ humana y su
implicación en la reparación del DNA mediante NHEJ**

ANA GÓMEZ BEDOYA

Madrid 2013

**Departamento de Biología Molecular
Facultad de Ciencias
Universidad Autónoma de Madrid**

**Análisis estructura-función de la DNA polimerasa λ humana y su
implicación en la reparación del DNA mediante NHEJ**

**ANA GÓMEZ BEDOYA
Licenciada en Bioquímica**

Director de Tesis: Profesor de Investigación Luis Blanco Dávila

Madrid 2013

Memoria presentada por Ana Gómez Bedoya, Licenciada en Bioquímica, para optar al Grado de Doctora en Biociencias Moleculares por la Universidad Autónoma de Madrid.

La presente Tesis Doctoral ha sido realizada bajo la supervisión del Dr. Luis Blanco Dávila, Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, adscrito al Centro de Biología Molecular Severo Ochoa.

Fdo: Luis Blanco Dávila

A mis padres

A mi hermano

A Miguel

"No era un vieja molécula más: tal y como Crick y yo estimábamos, el ADN es la estructura química que contiene la mismísima clave de la naturaleza de la materia viva. Almacena la información hereditaria y organiza el universo increíblemente complejo de la célula."
James D. Watson. (ADN El secreto de la Vida)

"Debe evitarse hablar a los jóvenes del éxito como si se tratase del principal objetivo en la vida. La razón más importante para trabajar en la escuela y en la vida es el placer de trabajar, el placer de su resultado y el conocimiento del valor del resultado para la comunidad."
Albert Einstein

Agradecimientos

Al final de una etapa es bueno mirar atrás y ver el camino recorrido, los momentos vividos, los baches superados y todas las personas que han formado parte de él. Hoy quiero dar las gracias por todas esas personas que han hecho posible "mi camino" y agradecerse a cada una personalmente.

En primer lugar quiero agradecer al Profesor Luis Blanco haberme dado la oportunidad de formar parte de su grupo. Gracias Luis por abrirme las puertas del mundo científico, por el tiempo dedicado, por la pasión con la que vives tu trabajo y por enseñarme siempre a ver la parte positiva de cada experimento.

A Francisco, por el tiempo que trabajamos juntos, por lo que aprendí de ti y de Pichia.

No me olvido de todas las personas que han pasado por el laboratorio (tanto el 122 como el 403) en estos años. Gracias a Ángel, Raguél, Arancha, Gloria, Paula, María S., Marivi, MJ, José, Vero, María, Susana, Sara, Ana A., Guille, Sandra, Estefanía, Alberto y Patri. Por los momentos de trabajo, congresos, limpiezas generales, risas, celebraciones y tantas otras cosas.

Arancha, gracias por tantos momentos compartidos en la "u" molona, por tu preocupación y por ser como eres. Ángel, gracias por tu apoyo en todo momento, por tu escucha, tus consejos, por compartir conmigo tu experiencia, por tu cercanía. Gloria, no sé si hay algo que te pueda decir que no te haya dicho ya. Gracias por ser algo más que una compi de laboratorio, por ser una especie de hermana mayor, por todos los ratos que hemos compartido dentro y fuera del CBM, por no haberte ido del todo y ser un apoyo constante en el día a día. Gracias por tu amistad.

Gracias María por tu paciencia y tus palabras de ánimo, por tu disponibilidad y enseñanzas. Gracias por ser "la mamá del laboratorio" y por compartir algo más que ciencia. Susi, gracias por ser como eres conmigo, por esos ratos compartidos en la cámara fría, por tus ganas de aprender y tu forma de escuchar. Aza!! Estar contigo, primero espalda con espalda y luego mano a mano, ha sido genial. Gracias por el día a día, por modernizarme musicalmente, por tu paciencia conmigo y las nuevas tecnologías. Por los ratos compartidos dentro y fuera del 403 y por los que espero nos queden por compartir. Sara, gracias por haber recorrido este camino en paralelo conmigo. Por los ratos de risas compartidos, las inquietudes, las confesiones durante el café, los desvarios en las tardes de invierno. Por descurbir juntas parte del globo terráqueo (¿Próximo destino?).

Abel, gracias por tus estancias en el 403, por ser uno más, por poner cordura y serenidad, por tu forma de ver las cosas.

Gracias a todas las personas del laboratorio de la Dra. Margarita Salas, por vuestra disposición siempre que he acudido a vosotros.

Gracias a todo el personal del CBM que hace el día a día más fácil, a los que nos recibís cada mañana con una sonrisa. A Gema y Cruz, por hacer más sencillo el mundo radioactivo. A José, por esos cafés que le devuelven a una la energía.

No me olvido de "las biólogas": Almu G., Almu F., Alicia, María, Diana y Jairo. Gracias por vuestro apoyo estos años. En especial a Eva, por apoyarme y escucharme en todo momento, por estar cerca desde el primer día de carrera.

Gracias a "mis chavales", parte muy importante de mi vida. Por la preocupación y ánimo que me habéis transmitido sobre todo este último año.

Cere, gracias por estar tan cerca estando en la otra punta del mundo, por tu forma de agotarme, por compartir las alegrías y animarme cuando el camino no ha sido fácil.

Iván, gracias por cuidarme y apoyarme siempre. Por estar dispuesto a escuchar, a tender una mano, a tener esa conversación reconfortante al final de un largo día. Gracias por saber sacarme una sonrisa. Helena, gracias por tu apoyo en estos últimos meses desde la perspectiva de quien ha recorrido primero el camino.

Un lugar especial ocupan mis padres, Inés y Goyo. Gracias por todos estos años de incansable apoyo y ánimo. Por educarme como lo habéis hecho, por enseñarme el significado de la palabra perseverancia, por no dejarme nunca tirar la toalla, por quererme y hacer que me quiera, por empujarme a ser feliz. Gracias también a ti hermano, por tu forma de ser y de preocuparte por mí. Sin vosotros no habría llegado hasta aquí.

Y por último gracias Miguel. Son muchas las etapas que hemos vivido juntos. Gracias por tu paciencia y entrega, por ayudarme a levantar, por quererme y hacerme feliz, por reír juntos, pero sobre todo por compartir tu vida conmigo y tener la ilusión de descubrir y recorrer nuevos caminos juntos.

ÍNDICE

RESUMEN	19
SUMMARY	23
INTRODUCCIÓN	27
1. Las DNA polimerasas	29
2. Mecanismos de polimerización.....	30
3. DNA polimerasas replicativas humanas	31
3.1 La Familia A	31
3.2 La Familia B	32
4. DNA polimerasas humanas implicadas en mecanismos de tolerancia al daño	33
4.1 La Familia Y	34
5. DNA polimerasas humanas implicadas en mecanismos de reparación del daño en el DNA	35
5.1 Reparación por escisión de nucleótido (NER)	35
5.2 Reparación de apareamientos erróneos (MMR)	35
5.3 Reparación por escisión de base (BER)	36
5.4 Reparación de roturas de doble cadena.....	38
5.4.1 Recombinación Homóloga (HR)	38
5.4.2 Reunión de extremos no homólogos (NHEJ)	38
5.5 Familia X de DNA polimerasas humanas.....	40
5.5.1 TdT.....	40
5.5.2 Pol μ	41
5.5.3 Pol β	43
5.5.4 Pol λ	45
5.5.5 Evolución de los miembros de la Familia X de DNA polimerasas	48
OBJETIVOS	51
MATERIALES Y MÉTODOS	55
1. Materiales.....	57
1.1 Enzimas	57
1.2 Reactivos	57
1.3 Nucleótidos	57

2. Métodos	57
2.1 Búsqueda de variantes polimórficas simples de hPolλ, análisis comparativo de secuencias y estudio estructural de residuos y motivos de las polimerasas de la Familia X	57
2.2 Clonaje y mutagénesis dirigida	58
2.2.1 Mutagénesis dirigida para la obtención de variantes polimórficas y de mutantes puntuales de hPolλ	58
2.2.2 Construcción de los vectores de expresión de <i>E. coli</i> que codifican para proteínas quiméricas hPolλ-hPolμ	58
2.3 Sobre-expresión y purificación de proteínas	59
2.3.1 Sobre-expresión y purificación de la DNA polimerasa humana Polλ y sus polimorfismos simples (R57W, T221P, T221S, S222F, T458R, S463T y R487W)	59
2.3.2 Sobre-expresión y purificación de los mutantes puntuales del dominio “broche” de hPolλ (W239Y, W239G, C241S, C241G, Q243R, Q243G, S245T, S245G)	60
2.3.3 Sobre-expresión y purificación de las proteínas quiméricas hPolλ-hPolμ	60
2.4 Marcaje e hibridación de los sustratos utilizados en los ensayos <i>in vitro</i>	60
2.5 Ensayos de polimerización de DNA	61
2.5.1 Ensayos de actividad en moléculas tipo molde/iniciador y <i>gap</i> de 5 nucleótidos	61
2.5.2 Ensayos de fidelidad en moléculas tipo <i>gap</i> de un nucleótido	61
2.5.3 Ensayos de polimerización independiente de molde (Transferasa terminal)	61
2.5.4 Análisis de la capacidad aceptar bases extra-helicoidales en el DNA	62
2.6 Análisis de la capacidad de unión del DNA mediante ensayos de retraso en gel	62
2.7 Ensayos de reparación de roturas de doble cadena mediante reunión de extremos no homólogos (NHEJ)	62
2.8 Ensayos de reparación por escisión de base. Análisis de la actividad deoxirribosa-fosfato liasa (dRP-liasa)	63

2.9 Ensayos de síntesis a través de lesiones.....	63
2.9.1 Estudio de la capacidad de inserción frente a la base modificada 8oxoG y de la capacidad de inserción de 8oxodGTP libre.....	63
2.9.2 Estudio de la capacidad de extensión de los pares erróneos 8oxodG:dC y 8oxodG:dA	64
2.9.3 Estudio de la capacidad de inserción frente a la base modificada 5-FU y de la capacidad de inserción de 5-FdUTP libre	64
2.10 Proteolisis parcial con Proteinasa K	65
RESULTADOS	69
1. Polλ y la reparación de roturas de doble cadena mediante NHEJ	71
1.1 Polλ en la reparación de roturas de doble cadena	73
1.2 Importancia de la complementariedad en la sinapsis	75
1.3 Importancia del grupo 5'P	80
1.4 Fidelidad en la reparación de DSBs	80
1.5 Estructura de los sustratos de DNA	81
1.5.1 Importancia del espacio: <i>nicks</i> versus <i>gaps</i>	81
1.5.2 Importancia de la sinapsis: distancia entre los dos <i>gaps</i>	82
1.6 Imperfecciones en las DSBs	83
1.6.1 Imperfecciones en el iniciador	83
1.6.2 Imperfecciones en el molde	86
1.7 Extremos dañados. Presencia de 8oxodG en la rotura	89
1.7.1 Presencia de 8oxodG en el DNA molde. Extensión de los pares formados 8oxodG:dA y 8oxodG:dC	90
1.7.2 Inserción de 8oxodGTP	91
2. El “ <i>nail</i> ” de Polλ: estabilización de bases extra-helicoidales y relevancia en NHEJ.....	93
2.1 Polλ posee en su dominio <i>pulgar</i> un <i>loop</i> característico relevante para su función	95

2.2 Capacidad de unión de Polλ(Nailμ) al DNA	97
2.3 La proteína quimérica Polλ(Nailμ) responde a la presencia del grupo 5'P y presenta un comportamiento fiel	99
2.4 Capacidad de Polλ(Nailμ) de dislocar la hebra molde	100
2.5 Estabilización de la base extra-helicoidal por Polλ(Nailμ)	101
2.6 Efecto del metal sobre la actividad de Polλ(Nailμ)	105
2.7 Extensión de apareamientos erróneos mediada por Polλ(Nailμ)	108
2.8 Influencia de la región del <i>nail</i> en NHEJ	109
 3. El Loop 1 de Polλ y la complementariedad de bases durante la reparación por NHEJ	111
3.1 Polλ presenta un Loop 1 en su dominio <i>palma</i>	113
3.2 Capacidad de unión de Polλ(Loop 1μ) y Polλ(Loop 1μ+Nailμ) al DNA	115
3.3 La presencia de un Loop 1 grande y móvil altera la actividad de síntesis de DNA de Polλ	116
3.4 La presencia del Loop 1 en Polλ no favorece su actividad transferasa Terminal	118
3.5 Actividad de Polλ(Loop1μ) y Polλ(Loop1μ+Nailμ) en NHEJ	119
3.6 La ausencia de Loop 1 de Polλ disminuye la eficiencia en el proceso de NHEJ	120
 4. Implicación del “broche” de Polλ en su función	123
4.1 Cambios conformacionales de las DNA polimerasas durante su ciclo catalítico	125
4.2 El broche de Polλ es prescindible en sustratos tipo GAP1P	128
4.3 El broche favorece el scrunching de Polλ	129
4.4 El motivo broche es esencial para Polλ en las reacciones de NHEJ	131
4.5 Mutaciones puntuales en el broche alteran la estructura de la polimerasa	133
 5. El dominio BRCT en la función de Polλ	135
5.1 El dominio BRCT y la Familia X de DNA polimerasas humanas	137
5.2 El dominio BRCT de Polλ y Polμ es intercambiable	138
5.3 Unión de Polλ(BRCTμ) y Polλ(BRCTμ+YACQRμ) al DNA	139

5.4 Reparación por NHEJ mediada por Pol λ (BRCT μ) y Pol λ (BRCT μ +YACQR μ)	141
6. Caracterización de polimorfismos simples de Pol λ	143
6.1 Variantes y polimorfismos simples en las DNA Polimerasas humanas	145
6.2 Variantes y polimorfismos simples en las DNA Polimerasas de la Familia X	145
6.2.1 Variantes y polimorfismos simples en Pol β	145
6.2.2 Variantes y polimorfismos simples en Pol μ	146
6.2.3 Variantes y polimorfismos simples en Pol λ	146
6.3 Las variantes y polimorfismos simples de Pol λ son activas y responden a la presencia del grupo P en el extremo 5' de un <i>gap</i>	150
6.4 Capacidad de unión al DNA	152
6.5 Las variantes y polimorfismos simples de Pol λ presentan actividad dRP liasa.....	153
6.6 Fidelidad de las variantes y polimorfismos simples de Pol λ	155
6.7 Determinación de los parámetros cinéticos del polimorfismo R487W	156
6.8 Síntesis a través de lesiones	157
6.8.1 Síntesis a través de lesiones: 5-Fluorouracilo (5-FU).....	157
6.8.1.1 Inserción frente a 5-FU	159
6.8.1.2 Inserción de 5-FdUTP en el DNA	162
6.8.2 Síntesis a través de lesiones: 7, 8-dihidro-8-oxoguanina (8oxoG)	163
6.8.2.1 Inserción frente a 8oxoG.....	164
6.8.2.2 Extensión de pares de bases con la base molde 8oxoG	167
6.8.2.3 Inserción de 8oxodGTP en el DNA	168
6.9 Implicación de las variantes de Pol λ en el mecanismo de reparación de NHEJ	170
6.9.1 Actividad en función de las complementariedad de bases.....	170
6.9.2 Fidelidad de las reacciones de NHEJ	171
6.10 Estructura de las variantes de Pol λ	172
DISCUSIÓN	177

1. Filogenia de las DNA polimerasas de la Familia X	179
2. Dominios estructurales que confieren identidad propia a las DNA polimerasas de la Familia X	182
2.1 Dominio BRCT	182
2.2 Dominio Ser/Pro	183
2.3 El <i>broche</i>	184
2.4 Dominio <i>palma</i>	186
2.5 Dominio <i>pulgar</i>	189
3. Reparación de roturas de doble cadena por Pol λ	192
4. Variantes y polimorfismos simples de Pol λ	193
CONCLUSIONES	201
BIBLIOGRAFÍA	205
ANEXO	225
1. Abreviaturas	227
2. Glosario	233
3. Artículo relacionado con esta Tesis Doctoral.....	237

RESUMEN

En los últimos años se ha descrito el papel de la DNA polimerasa de la Familia X Pol λ en el mecanismo de reparación por reunión de extremos no homólogos (NHEJ) y su interacción con los factores implicados en el mismo. A lo largo de esta Tesis Doctoral hemos puesto a punto un ensayo *in vitro* de reparación por NHEJ en ausencia de los factores auxiliares para Pol λ , estudiando la fidelidad del proceso, la dependencia del metal y la complementariedad mínima necesaria para llevarlo a cabo. Puesto que las roturas de DNA casi nunca producen extremos protuberantes compatibles hemos profundizado en la capacidad de Pol λ de resolver roturas cuyos extremos no son los idóneos, demostrando que es capaz de tolerar desapareamientos y bases extra, así como daños en el DNA tan comunes como la 8oxoG. La eficiencia de la reacción de NHEJ fue estudiada en función de la distancia entre los *gaps* que flanquean la rotura, del tamaño de los mismos y del tipo de complementariedad que forman los extremos del DNA.

El papel de Pol μ , también miembro de la Familia X, en la reparación de roturas de doble cadena por NHEJ también ha sido ampliamente estudiado con anterioridad. Sin embargo, Pol λ y Pol μ parecen no tener un papel redundante en este mecanismo. Existen dos dominios específicos que las diferencian: el Loop 1 (grande y móvil en Pol μ y pequeño en Pol λ) y el “*nail*” (presente en Pol λ , pero ausente en Pol μ). Hemos profundizado en el estudio estructura-función de Pol λ mediante la obtención de proteínas quiméricas en las que tanto el Loop 1 de Pol λ como la región del *nail* han sido intercambiados por los de Pol μ . Así, observamos que ambos dominios no son intercambiables y que confieren identidad propia a cada polimerasa, estando íntimamente relacionados con sus propiedades bioquímicas y su especificidad durante las reacciones de NHEJ. El análisis estructural de Pol λ ha sido completado con el intercambio de su dominio BRCT por el de Pol μ (con el que comparte un 23% de identidad de secuencia de aminoácidos). En esta Tesis Doctoral se analiza asimismo una región de Pol λ no caracterizada previamente denominada “*broche*”. Esta región esta formada por 5 residuos (WVCAQ) situados entre el dominio Ser-Pro y el *core* tipo Pol β . Mediante mutagénesis dirigida, hemos demostrado la importancia del *broche* en el mantenimiento de una conformación cerrada a lo largo de su ciclo catalítico. Alteraciones de los residuos más conservados de esta región provocan una disminución en la eficiencia con la que Pol λ lleva a cabo sus funciones.

Por último, a lo largo de este trabajo hemos caracterizado bioquímicamente algunos de los polimorfismos naturales (SNP) de Pol λ e isoformas asociadas a procesos tumorales. Todas las variantes estudiadas pudieron formar complejos estables E:DNA y llevar a cabo una síntesis distributiva, además de mantener su actividad dRP liasa. Sin embargo, algunas de ellas presentaron un comportamiento alterado en la tolerancia al DNA, en la extensión de desapareamientos o en la reparación de roturas en el DNA por NHEJ. Debemos destacar que el polimorfismo R487W tiene alterados sus parámetros cinéticos como consecuencia de la modificación estructural que provoca este cambio en el dominio “*palma*”.

SUMMARY

In the past few years, the role of the Family X DNA polymerase Pol λ in the repair of double strand breaks by non-homologous end joining (NHEJ) has been described, as well as its interaction with NHEJ factors. An *in vitro* NHEJ assay for Pol λ in the absence of these factors has been set up throughout this PhD thesis, studying the accuracy of the process, as well as the metal influence and the minimal homology required. As the DNA breaks do not always produce perfect complementary ends, we have also analysed the ability of Pol λ to deal with DNA ends containing mismatches, flip-out bases and oxidative damage (8oxoG). The distance between the two gaps of the break, their length and the level of homology were also studied as factors that delineate the efficiency of the reaction.

The role of Pol μ , also a member of Family X polymerases, in NHEJ has been studied in depth as well. However, both polymerases seem not to have redundant roles in this mechanism. There are two main domains that make them different: the Loop 1 (larger and mobile in Pol μ and smaller in Pol λ) and the “*nail*” (present in Pol λ and absent in Pol μ). We carried out a deep analysis of the structure-function relationships in Pol λ by constructing quimeric proteins, where the Loop 1 and *nail* of Pol λ were substituted for those corresponding to Pol μ . Our results indicate that they are not interchangeable but confer each polymerase its own identity, specific biochemical properties and functionality during NHEJ process. The structural analysis of Pol λ has been completed interchanging the BRCT domain of Pol λ for that of Pol μ (these two enzymes share 23% of amino acid sequence identity).

This thesis also includes the analysis of a previously uncharacterized region in Pol λ called “*brooch*”. The *brooch*, formed by 5 residues (WVCAQ), is located between the Ser-Pro region and the Pol β -like core. By site-directed mutagenesis, we have demonstrated the significance of the brooch to maintain the “closed” conformation of Pol λ throughout its catalytic cycle. Alterations of the most conserved residues of this region bring about a decrease of Pol λ ’s efficiency.

Finally, we have carried out the identification and *in vitro* characterization of single nucleotide polymorphisms (SNPs) of Pol λ and some cancer-related isoforms. All of them were able to form stable E:DNA complexes, and retained a distributive DNA polymerization and dRP lyase activity. However, some of them revealed a disrupted behaviour regarding the DNA damage tolerance, as well as mismatch extension and DNA repair by NHEJ. It should be pointed out that the R487W SNP has altered its kinetic parameters due to the structural modification caused by the change in the “*palm*” domain.

INTRODUCCIÓN

La mayoría de los organismos vivos poseen la información genética almacenada en forma de ácido desoxirribonucleico (DNA). Esta información debe ser transmitida a las células hijas sin ser alterada con el objetivo de mantener la estabilidad genómica. Existen dos procesos fundamentales encargados del mantenimiento y la integridad del genoma: la replicación y la reparación del DNA. La replicación es el proceso por el cual se duplica, de forma libre de error, la información contenida en el DNA permitiendo su transmisión de una generación a otra. La reparación implica diversos mecanismos que intentan restaurar la secuencia del DNA cuando ésta es alterada por diferentes daños (endógenos y exógenos) a los que el DNA está expuesto de manera continua. Cuando la replicación de DNA se enfrenta a daños que no han podido ser reparados previamente, es necesario un cierto grado de tolerancia para permitir el avance de la horquilla de replicación. En el conjunto de las maquinarias de replicación, reparación y tolerancia al daño en el DNA juegan un papel fundamental las enzimas denominadas DNA polimerasas.

1. Las DNA polimerasas

Apenas unos años después de que J.D. Watson y F.H. Crick describieran la estructura del DNA como una doble hélice anti-paralela (Watson et al., 1953), el grupo de A. Kornberg descubrió la primera DNA polimerasa, la DNA polimerasa I (Pol I) de *E. coli* (Lehman et al., 1957). Esta DNA polimerasa es capaz de sintetizar DNA de acuerdo al dictado de la cadena molde, lo que fue clave para comprender cómo se produce la replicación del DNA dentro de la célula y sentó la base para numerosos estudios posteriores. Actualmente se conocen numerosas polimerasas implicadas no solo en los mecanismos de replicación y reparación del DNA sino también en mecanismos de tolerancia al daño, recombinación y mutagénesis.

Todas las polimerasas descritas hasta la fecha comparten una estructura básica común: su plegamiento se asemeja a una mano derecha, con tres dominios principales llamados “*dedos*”, “*palma*” y “*pulgar*” (Ollis et al., 1985). Solo la DNA polimerasa del virus de la peste porcina africana carece del dominio *dedos* (Oliveros et al., 1997; Maciejewski et al., 2001; Showalter, 2001). En el dominio *palma* se encuentran los residuos implicados en la catálisis. El dominio *dedos* contribuye a la interacción con el nucleótido entrante así como con la base molde del DNA. Por su parte, el dominio *pulgar* juega un papel muy importante a la hora de colocar el dúplex de DNA. Sin embargo, a pesar de esta conformación general, la gran diversidad de funciones entre las diferentes polimerasas requiere una diferenciación de sus características bioquímicas y estructurales. Así, existen polimerasas con dominios que confieren actividades adicionales como la actividad exonucleasa o desoxirribosa-fosfato liasa, entre otras. También existen dominios adicionales que favorecen la interacción con otras proteínas o incluso con el DNA. Bioquímicamente las polimerasas se pueden clasificar en función del número de nucleótidos que son capaces de incorporar antes de disociarse del

DNA (distributivas: unos pocos eventos de polimerización; procesivas: cientos de nucleótidos incorporados) o en función del tipo de sustrato preferido (sustratos de DNA tipo molde/iniciador, DNA con pequeños huecos o *gaps*, DNA con lesiones...). Finalmente, una de las diferencias fundamentales de las polimerasas es su fidelidad de síntesis, es decir la capacidad de seleccionar el nucleótido correcto, evitando así la generación de desapareamientos, inserciones o deleciones de nucleótidos (Kunkel et al., 2000; Kunkel, 2004; Kunkel, 2009). Las polimerasas más fieles son las polimerasas replicativas ayudadas por su actividad exonucleasa 3'→5' correctora de errores. Por otro lado, existen procesos que requieren generación de variabilidad, como el desarrollo del sistema inmunológico, donde se ven implicadas polimerasas con una fidelidad de síntesis muy baja.

2. Mecanismo de polimerización

Funcionalmente y desde un punto de vista químico, todas las polimerasas comparten un mecanismo común que comienza con el ataque nucleofílico del extremo 3'OH de una cadena de DNA iniciadora sobre el fosfato α del desoxinucleótido trifosfato (dNTP) entrante. Algunas DNA polimerasas pueden utilizar como iniciadores, no solo el DNA o el RNA, si no también aminoácidos como la Ser, Thr o Tyr de una proteína terminal (Blanco et al., 1984; Salas, 1991). Análisis de secuencia y estudios estructurales sugieren que el proceso de síntesis se produce por un mecanismo catalizado por 2 metales divalentes como se describió en un primer momento para la reacción 3'-exonucleasa de Pol I de *E. coli* (Beese et al., 1991). La primera evidencia estructural de una DNA polimerasa en complejo con un dúplex de DNA tipo molde/iniciador, junto con el dNTP entrante y Mg^{2+} , fue la DNA polimerasa beta (Pol β) de rata (Pelletier et al., 1994). Los dos iones de Mg^{2+} interaccionan con 3 grupos carboxilos presentes en el dominio *palma*. El metal A interacciona con el grupo 3'OH del iniciador facilitando el ataque nucleofílico sobre el fosfato α del dNTP entrante. El metal B estabiliza los fosfatos del dNTP y facilita la liberación del pirofosfato (PPi). Ambos metales, A y B estabilizan la estructura y el estado de transición durante la reacción (**Figura 1**). Una vez liberado el PPi, el enzima se disociará del DNA si es distributiva o llevará a cabo un nuevo evento de polimerización si es procesiva. En este caso debe translocar para poder unir un nuevo dNTP. Poco se sabe sobre estos pasos aunque las evidencias sugieren que son pasos muy rápidos. (Patel et al., 1991; Hanes et al., 2008).

Un estudio reciente del mecanismo de polimerización a tiempo real de la DNA polimerasa η (Pol η) pone de manifiesto que intervienen hasta 3 iones metálicos durante la catálisis (Nakamura et al., 2012). El tercer Mg^{2+} tendría un papel importante en la neutralización de la carga negativa que se forma en el estado de transición, así como en la protonación del PPi. Análisis estructurales previos de otras enzimas implicadas también en procesos de transferencia de grupo fosfato demostraron también

la participación de 3 metales en la reacción. Es el caso de la fosfatasa alcalina y de la endonucleasa IV (Kim et al., 1991; Garcin et al., 2008;).

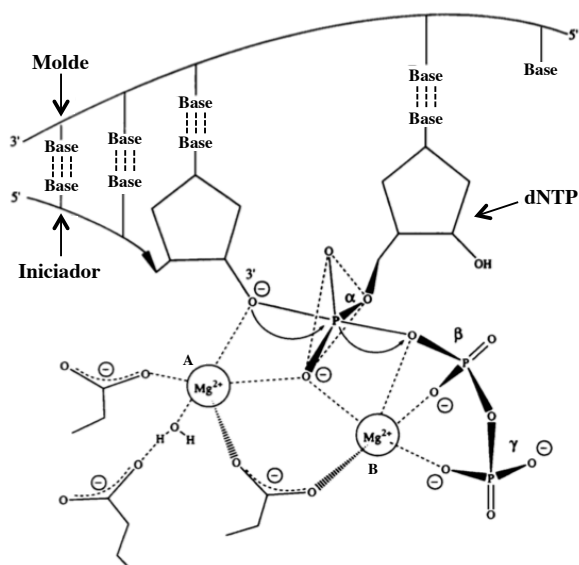


Figura 1. Estabilización del estado de transición por los metales A y B durante el proceso de polimerización. El metal A estabiliza el extremo 3'OH del iniciador mientras que el metal B estabiliza los fosfatos del dNTP entrante.

Las DNA polimerasas se clasifican en familias en función de la identidad de secuencia que comparten con las primeras DNA polimerasas descritas en *E. coli* (Ito et al., 1991; Braithwaite et al., 1993). La Familia A está formada por las polimerasas homólogas a la Pol I de *E. coli*. En la Familia B se incluyen las polimerasas similares a la Pol II de *E. coli*. La Familia C, sin representación en eucariotas, engloba las homólogas a la Pol III de *E. coli* (Burgers et al., 2001). La Familia D está formada por DNA polimerasas presentes únicamente en arqueas (Cann et al., 1999). La Familia X está compuesta por polimerasas que participan en los procesos de reparación del DNA y generación de variabilidad (revisado por Yamtich et al., 2010). Por último, la Familia Y incluye DNA polimerasas capaces de sintetizar a través de lesiones presentes en el DNA (revisado por Sale et al., 2012). La **Tabla 1** recoge las DNA polimerasas humanas conocidas hasta el momento.

3. DNA polimerasas replicativas humanas

3.1 Familia A

La Familia A está formada por 3 polimerasas. La más conocida es la Pol γ , formada por dos subunidades: Pol γ A posee actividad polimerasa, exonucleasa 3'→5' y desoxirribosa-fosfato (dRP) liasa; Pol γ B estimula la actividad exonucleasa y aumenta la afinidad por el DNA y la procesividad (Lim et al., 1999; Carrodegua et al., 2001). Pol γ es la única DNA polimerasa encontrada en mitocondrias hasta la fecha (Graziewicz et al., 2006), por lo que se encarga no solo de la replicación

del genoma mitocondrial, sino también de la reparación del mismo por el mecanismo de reparación por escisión de bases (BER).

Las otras dos polimerasas de esta familia son Polθ (Sharief et al., 1999) y Polv (Marini et al., 2003). Ambas enzimas carecen de actividad exonucleasa y poseen una baja fidelidad (Arana et al., 2008; Mercedes et al., 2007). Polθ posee actividad desoxirribosa-fosfato (dRP) liasa por lo que puede estar implicada en el mecanismos de reparación por escisión de bases (BER) (Prasad et al., 2009); además, ha sido implicada en la síntesis a través de lesiones y en procesos de hipermutación somática (Masuda et al., 2005; revisado por Yousefzadeh et al., 2012). El papel de Polv en mecanismos de síntesis a través de lesiones ha sido estudiado más en profundidad en los últimos años (Yamanaka et al., 2010; Zietlow et al., 2010).

Denominación griega	Denominación HUGO	Familia	Función propuesta
Polγ (gamma)	POLG	A	Replicación/Reparación DNA mitocondrial
Polθ (theta)	POLQ	A	Síntesis a través de lesiones; SHM
Polv (nu)	POLN	A	Síntesis a través de lesiones
Polα (alpha)	POLA	B	Replicación nuclear; HR
Polδ (delta)	POLD1	B	Replicación nuclear; NER; MMR; HR
Polε (epsilon)	POLE	B	Replicación nuclear; NER; MMR; HR
Polζ (zeta)	POLZ	B	Síntesis a través de lesiones
Polη (eta)	POLH	Y	Síntesis a través de lesiones
Polι (iota)	POLI	Y	Síntesis a través de lesiones
Polκ (kappa)	POLK	Y	Síntesis a través de lesiones
	REV1	Y	Síntesis a través de lesiones
Polβ (beta)	POLB	X	BER
Polλ (lambda)	POLL	X	Meiosis; BER; NHEJ; V(D)J
Polμ (mu)	POLM	X	SHR; NHEJ; V(D)J
	TDT	X	V(D)J

Tabla 1. Familias de DNA polimerasas humanas. SHM: Hipermutación somática; HR: Recombinación homóloga; NER: Reparación por escisión de nucleótido; MMR: Reparación de desapareamientos; BER: Reparación por escisión de base; NHEJ: Reunión de extremos no homólogos; V(D)J: Recombinación específica de genes receptores de antígeno.

3.2 La Familia B

Las DNA polimerasas de la Familia B, junto con un gran número de proteínas accesorias, son las polimerasas responsables de la replicación del DNA nuclear (revisado por Burgers, 2008). Para que pueda comenzar la replicación del DNA, el complejo MCM2-7 media el desenrollamiento de la

doble hélice (Johnson et al., 2005). Es entonces cuando el complejo Pol α /primasa sintetiza pequeños iniciadores de RNA (10 nucleótidos) en el origen de replicación de la hebra líder y a lo largo de la hebra retardada para formar los fragmentos de Okazaki. Gracias a su actividad polimerasa es capaz además de extender estos iniciadores de RNA dando lugar a fragmentos de DNA de entre 20 y 30 nucleótidos. Éstos serán los iniciadores que utilicen la Pol ϵ y la Pol δ durante la replicación de la hebra líder y retardada, respectivamente. Durante la replicación del DNA las polimerasas interaccionan con el Antígeno Nuclear de Proliferación Celular (PCNA) aumentando así su afinidad por el DNA y su procesividad (Kelman, 1997)

Tanto Pol ϵ como Pol δ se caracterizan por poseer una elevada fidelidad de síntesis gracias a su capacidad de seleccionar el nucleótido correcto. El centro activo de estas polimerasas está diseñado para aceptar únicamente pares de bases de Watson-Crick, rechazando aquellos que no poseen esta geometría (Kunkel et al. 2000; Shcherbakova et al., 2003). Esta alta fidelidad es también debida a su actividad exonucleasa 3'→5' correctora de errores.

La DNA polimerasa ζ (Pol ζ) es la excepción de esta familia. Aunque su papel no está del todo claro, es relativamente infiel y su capacidad de extender bases mal apareadas con mayor eficiencia que otras polimerasas ha llevado a algunos autores a proponer su implicación en procesos de síntesis a través de lesiones (Nelson et al., 1996; Lawrence, 2004; Gan et al., 2008).

La Familia B está además implicada en mecanismos de reparación que requieren la síntesis de fragmentos de DNA: Reparación por escisión de base (BER), reparación por escisión de nucleótido (NER), reparación de bases mal apareadas (MMR) o recombinación homóloga (RH) (Hübscher et al., 2002).

4. DNA polimerasas humanas implicadas en mecanismos de tolerancia al daño

Las células están continuamente expuestas a diferentes tipos de daños, tanto endógenos (propios del metabolismo celular), como exógenos (generalmente factores ambientales tales como radiaciones o agentes químicos). Estos factores pueden alterar la estabilidad y la integridad del genoma causando daños en el código genético. Entre los factores exógenos destaca la luz ultravioleta o las radiaciones ionizantes que pueden alterar la estructura del DNA. Los factores endógenos dañinos para la células llegan hasta los 20.000 por célula y día (Lindahl et al., 1993). Entre ellos encontramos las especies reactivas de oxígeno (ROS) o las modificaciones espontáneas como la generación de sitios abásicos o la deaminación de bases que tiene como consecuencia cambios en la secuencia del DNA. El centro activo de las polimerasas replicativas es compacto e incompatible con estas lesiones, lo que supone un bloqueo eventual de la horquilla de replicación. Este hecho supone una problema para la célula que debe terminar de replicar el DNA antes de la mitosis, para que cada célula hija posea

un copia íntegra del genoma. Las células han adoptado diversos mecanismos de tolerancia al daño, es decir, estrategias que disminuyen el efecto letal de la parada de replicación cuando no ha sido posible eliminar el daño en el DNA. Existen polimerasas especializadas en el proceso de síntesis a través de lesiones (TLS), la mayoría de ellas pertenecientes a la Familia Y de DNA polimerasas.

4.1 Familia Y

La Familia Y de DNA polimerasas humanas está formada por las polimerasas Pol η , Pol ι y Pol κ y REV1 (revisado por Prakash et al., 2005). Se caracterizan por llevar a cabo una síntesis distributiva, por su baja eficiencia catalítica y su baja fidelidad (Kunkel, 2004). Carecen de actividad exonucleasa 3'→5' y todas son capaces de interaccionar con PCNA, hecho que ha permitido establecer modelos para el intercambio de proteínas en la horquilla de replicación (Pagès et al., 2002) y cuya regulación postraduccional afecta directamente a estas polimerasas (Ulrich, 2004). A pesar de la baja identidad de secuencia con las polimerasas replicativas, la Familia Y también posee una estructura en forma de mano derecha con algunas particularidades: el centro activo es más abierto, quedando por tanto más expuesto y permitiendo acomodar las lesiones presentes en el DNA (**Figura 2**). Además, los dominios *dedos* y *pulgar* son más pequeños que en las polimerasas replicativas, disminuyendo así sus contactos con el DNA y el nucleótido entrante y por tanto su procesividad y fidelidad. Además, disminuye el número de cadenas laterales cargadas que permiten discriminar entre un DNA no dañado y uno dañado. Sin embargo, poseen un dominio adicional denominado “meñique” que media los contactos con la zona dañada del DNA y determina la selectividad de estas polimerasas ante diferentes lesiones (Boudsocq et al., 2004). Así, Pol η esta especializada en hacer frente a los dímeros de timina (Biertümpfel et al., 2010), mientras que Pol ι participa en la síntesis a través de lesiones ante la presencia en el DNA de la base modificada 8-oxoguanina (Kirouac et al., 2011).

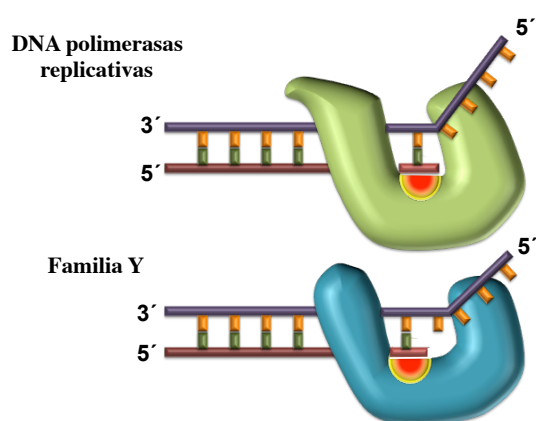


Figura 2. Modelo de las estructuras de los centros activos de polimerasas replicativas y de la Familia Y. Las polimerasas replicativas (arriba) poseen un centro activo más pequeño capaz de acomodar únicamente una base molde. Las polimerasas de la Familia Y (abajo) poseen un centro activo más abierto, capaz de unir dos bases molde, con dominios *dedos* y *pulgar* más pequeños.

Algunas de las lesiones en el DNA pueden requerir únicamente una polimerasa. Sin embargo, en la mayoría de los casos el proceso de TLS requiere de dos polimerasas (revisado por Livneh et al., 2010): la primera de ellas (generalmente Pol η , Pol ι o Pol κ) inserta el nucleótido frente a la lesión que

será posteriormente extendida por la segunda polimerasa (comúnmente Pol ζ , perteneciente a la Familia B).

Por último, cabe destacar que las polimerasas de la Familia Y están también relacionadas con funciones “no canónicas” como procesos de recombinación homóloga, replicación a través de un cuádruple de guanina, o actuando como generadoras de variabilidad en el proceso de hipermutación somática (revisado por Sale et al., 2012).

5. DNA polimerasas humanas implicadas en mecanismos de reparación del daño en el DNA

Los daños a los que se enfrenta constantemente la célula pueden implicar roturas de banda simple, roturas de doble cadena, apareamientos incorrectos o “cross-link” intra- o inter-catenarios (**Figura 3**). Para resolver estas situaciones se han desarrollado diferentes mecanismos de respuesta al daño en el DNA (DDR) coordinados para la detección del daño en el DNA, la posterior acumulación de los factores de reparación en el lugar de la lesión y la reparación final de dicha lesión. En estos procesos intervienen DNA polimerasas de diferentes familias (ver Tabla 1) pero en ellos juega un papel fundamental la Familia X de DNA polimerasas. En este apartado describiremos los diversos procesos de reparación así como las principales propiedades de las polimerasas de esta familia.

5.1 Reparación por escisión de nucleótido (NER)

Por el mecanismo de NER se reparan principalmente las lesiones que distorsionan la estructura de doble hélice del DNA, causadas generalmente por luz UV, dificultando los procesos de replicación y transcripción. Se clasifica en NER global del genoma, aquella que se activa cuando la lesión se produce en cualquier lugar del genoma y en NER acoplada a la transcripción, es decir, aquella que se activa cuando la RNA polimerasa encuentra una lesión en el proceso de transcripción. La diferencia entre ambos reside en las enzimas que actúan como sensor del daño (Laat et al., 1999). El resto del proceso es común: las helicasas abren la doble hélice, se escinde el DNA que contiene la lesión y se sintetiza de nuevo el DNA por la maquinaria de replicación. La endonucleasa ERCC1 es clave durante el proceso.

5.2 Reparación de apareamientos erróneos (MMR)

Es uno de los mecanismos más importantes de la DDR. Ocurre principalmente durante la replicación del DNA al insertarse nucleótidos incorrectos o bien por generarse desapareamientos cuando la DNA polimerasa se desliza a lo largo del molde, creando pequeños bucles o protuberancias en la doble cadena. Numerosas actividades enzimáticas participan en esta reparación que comienza con el reconocimiento del error, la escisión de parte de la hebra de nueva síntesis que debe ser

reparada y su posterior reparación por polimerasas de replicación (Pol ϵ y la Pol δ). Entre los enzimas implicados destacan MSH2 y MLH1, homólogos de mutS y mutL (revisado por Schofield et al, 2003).

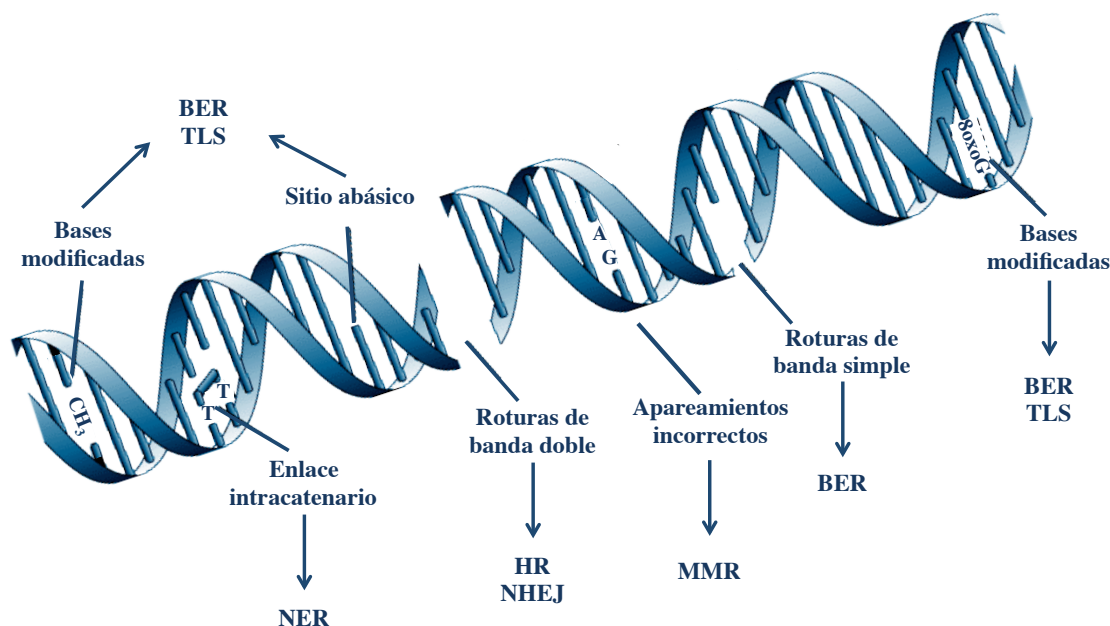


Figura 3. Tipos de lesiones causadas en el DNA y sus mecanismos de reparación y tolerancia al daño. BER: reparación por escisión de base; NER: Reparación por escisión de nucleótido; MMR: Reparación de apareamientos erróneos; HR: Recombinación homóloga; NHEJ: Reunión de extremos no homólogos; TLS: síntesis a través de lesiones.

5.3 Reparación por escisión de base (BER)

Es el principal mecanismo encargado de reparar la pérdida de bases en el DNA, la presencia de bases modificadas por fenómenos de alquilación, oxidación o desaminación o la inserción de bases modificadas en el DNA como dUTP u 8-oxo-dGTP (revisado por Fortini, 2003). En mamíferos se conocen dos rutas de BER: BER de trecho corto (reemplazando solo un nucleótido) y BER de trecho largo (conlleva la síntesis de 2 a 10 nucleótidos) (Dogliotti et al., 2001). En ambas vías una DNA glicosilasa específica reconoce y retira la base modificada quedando un sitio abásico en el DNA. El enlace fosfodiéster en posición 5' del sitio abásico será eliminado por la APE endonucleasa, dejando un *nick* en el DNA con un residuo 3'OH y un residuo desoxirribosa fosfato (dRP) en posición 5'. En BER de trecho corto (**Figura 4A**), este residuo es eliminado gracias a la actividad dRP liasa de una polimerasa que rellena el *gap* que queda en el DNA. Puede suceder que el residuo dRP sea eliminado por una glicosilasa que posea también actividad AP-liasa, en cuyo caso la polinucleótido quinasa (PNK) con sus actividades 5' DNA quinasa y 3' DNA fosfatasa, repone el grupo OH y el grupo P en posición 3' y 5' respectivamente. Posteriormente la polimerasa rellena el *gap* formado y una ligasa sella de nuevo la unión (DNA ligasa I o el complejo XRCC1/Ligasa III). En el BER de trecho largo (**Figura 4B**) entra en juego cuando el residuo dRP está modificado (oxidado o reducido) y no puede ser

eliminado. Entonces se produce una síntesis de DNA asociada a desplazamiento de banda, generando una cadena sencilla de longitud equivalente que será eliminada por la endonucleasa FEN1. La ligasa terminará el proceso uniendo las dos cadenas.



Figura 4. Mecanismo de reparación por escisión de base (BER). Reconocimiento del daño por la DNA glicosilasa y generación de un *nick* en el DNA por la APE endonucleasa. En BER de trecho corto (A) una DNA polimerasa elimina el residuo dRP y rellena el *gap*. En BER de trecho largo (B) se produce síntesis de DNA asociado a desplazamiento de banda que será eliminada por FEN-1. En ambos casos finalmente la DNA ligasa une las dos cadenas. El DNA nueva síntesis se indica en verde.

Son varias las DNA polimerasas que participan en BER. La implicación de Pol β , perteneciente a la Familia X, ha sido demostrada tanto *in vitro* como *in vivo* (Kubota et al., 1996; Sobol et al., 1996), así como su interacción con proteínas implicadas en el proceso como la AP-endonucleasa (Bennett et al., 1997), la DNA ligasa I (Dimitriadis et al., 1998) y el heterodímero XRCC1/DNA ligasa III (Caldecott et al., 1996). Estas interacciones podrían facilitar la coordinación de los sucesivos pasos enzimáticos del proceso. Pol β , juega además un papel importante en la vía BER de trecho largo, iniciando la síntesis de DNA y el desplazamiento de banda para que las polimerasas replicativas (Pol ϵ y Pol δ) continúen la polimerización. Otras polimerasas implicadas en el mecanismo de BER son Pol λ , perteneciente también a la Familia X y con actividad dRP lisasa (García-Díaz et al., 2000; García-Díaz et al., 2001), y la Pol ι de la Familia Y, implicada en un proceso más especializado de BER (Bebenek et al., 2001). Por su parte, Pol γ , se encargaría de la reparación por escisión de bases en mitocondrias.

5.4 Reparación de roturas de doble cadena

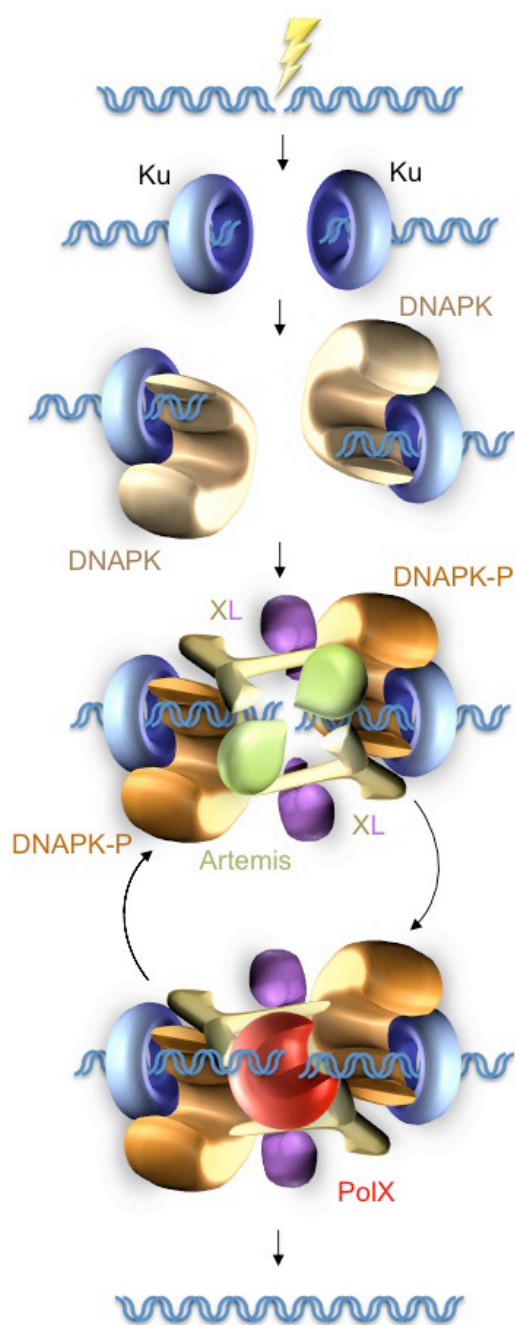
Las roturas de doble (DSB) pueden ocurrir durante procesos fisiológicos como la replicación o la meiosis, por agentes externos como la IR (Morgan et al., 1996) o como consecuencia del metabolismo celular (Karanjawala et al., 2002). Son especialmente peligrosas para la célula, pudiendo provocar pérdidas de información genética, reordenamientos cromosómicos (translocaciones, inversiones, deleciones) que desemboquen en procesos tumorales (Mills et al., 2003) mediados por la activación de oncogenes o la inactivación de genes supresores de tumores, o incluso la muerte celular. Por tanto, la reparación de estas roturas es esencial para la estabilidad genómica y la supervivencia celular. Para ello los organismos eucariotas han desarrollado dos mecanismos principales para su reparación: la recombinación homóloga (HR) y la reunión de extremos no homólogos (NHEJ). En mamíferos, la reunión de extremos no homólogos ocurre a lo largo de todo el ciclo celular, mientras que la recombinación homóloga se da al final de la fase S y en G2 (Takata et al., 1998; Lieber, 2008;). Ambos mecanismos pueden operar de manera coordinada (Shrivastav et al., 2008).

5.4.1 Recombinación Homóloga (HR)

La recombinación homóloga se basa en la existencia de una segunda copia de la región a reparar, que sirve de molde para la síntesis de DNA, permitiendo restaurar la integridad del genoma dañado de manera fiel (revisado por West, 2003). Requiere el procesamiento de los extremos de DNA por parte de una endonucleasa, generándose así una cadena simple de DNA a la que se unirán las proteínas necesarias para la reparación. La Proteína Replicativa A (RPA) recubre el DNA eliminando su estructura secundaria y permitiendo la unión de Rad51 y Rad52. Rad55 y Rad57 interaccionan también con este filamento nucleoproteico. Rad51 promueve la invasión de la cromátida hermana permitiendo el intercambio con el DNA homólogo y la reparación final del daño. Gracias a que es un mecanismo fiel se garantiza el mantenimiento de la estabilidad genómica.

5.4.2 Reunión de extremos no homólogos (NHEJ)

En el mecanismo de reparación mediante NHEJ, la homología en la secuencia a reparar es nula o de unos pocos nucleótidos. Las proteínas implicadas en este proceso no reconocen la secuencia si no la estructura del DNA dañado (revisado por Lieber et al., 2004). Puede ser un proceso mutagénico, contribuyendo a la variabilidad genómica y estando a su vez implicado en procesos celulares como la generación de anticuerpos. Es el principal proceso de reparación en eucariotas superiores, teniendo lugar a lo largo de todo el ciclo celular.



El primer paso es el reconocimiento de la rotura por el heterodímero Ku70/Ku80, que rodea el dúplex el DNA impidiendo su posible degradación (Walker et al., 2001) (**Figura 5**). A continuación, la DNA-PK se une a ambos lados (Gottlieb et al., 1993), induciendo la internalización del heterodímero Ku y favoreciendo la unión de ambos extremos de la rotura mediante interacciones proteína-proteína (Yaneva et al., 1997; Chen et al., 2000). En la mayoría de los casos, los extremos no pueden ser unidos directamente, sino que deben ser procesados. Análisis de secuencias en la zona de las roturas, han puesto de manifiesto que este procesamiento requiere el alineamiento a través de microhomologías de secuencia (1-4 nucleótidos) (Roth et al., 1986; Kramer et al., 1994). Si no existe homología en las secuencias, ésta puede ser generada gracias a otras actividades enzimáticas como nucleasas o DNA polimerasas (Wilson et al., 1999), necesarias en ocasiones para eliminar distorsiones o *gaps* que surgen consecuencia del alineamiento (revisado por Hefferin et al., 2005).

Figura 5. Mecanismo de reparación de DSBs por NHEJ en eucariotas. El heterodímero Ku70/Ku80 es el primero que se une a la rotura. A continuación la DNA-PK es reclutada junto con Artemis que procesa los extremos actuando como endonucleasa, generándose DNA de banda simple y disociándose posteriormente del complejo. Las polimerasas de la Familia X rellenan los *gaps* que quedan y finalmente el complejo XRCC4/ligasa IV liga las cadenas de DNA. (Tomado de la Tesis Doctoral de María José Martín Pereira).

Las proteínas necesarias para el procesamiento de los extremos son reclutadas por el complejo Ku/DNA-PK. La 3'→5' exonucleasa Artemis es fosforilada por la DNA-PK y la polinucleotido kinasa (PNK) puede intervenir también en el proceso (Chappell et al., 2002). Si tras el procesamiento los extremos son compatibles, el complejo XRCC4/ligasa4 es reclutado, teniendo lugar la ligación final de las cadenas de DNA (Grawunder et al., 1997; Teo et al., 1997; Wilson et al., 1997). Sin embargo, si los extremos no son compatibles, una DNA polimerasa deberá rellenar los *gaps* generados durante el alineamiento de las cadenas. Las DNA polimerasas Polμ (Domínguez et al., 2000a) y Polλ (García-

Díaz et al., 2000), ambas pertenecientes a la Familia X participan en este proceso (Ma et al., 2002; Mahajan et al., 2002; Lee et al., 2004; Ma et al., 2004; Ramsden, 2011). Pol μ puede aprovechar su actividad transferasa terminal para generar conectividad en extremos incompatibles (Juárez et al., 2006), mientras que Pol λ requiere complementariedad de secuencia entre los extremos a reparar (revisado por Ramsden, 2011).

En los últimos años se ha identificado en mamíferos un factor similar a la proteína XRCC4 denominado XLF (XRCCA-Like Factor) o Cernunnos, que interacciona con el complejo XRCC/DNA ligasa IV promoviendo la ligación de los extremos (Ahnesorg et al., 2006; Hentges et al., 2006). En el mecanismo de NHEJ de *S. cerevisiae* intervienen las proteínas Ku70/Ku80, el complejo MRX (Mre11-Rad50-Xrs2), la DNA ligasa 4 (Dnl4), XRCC4 (Lif1), Nej1 (homólogo de XLF) y ScPolIV: no se han identificado los homólogos de DNA-PK y Artemis (Daley et al., 2005). En *S. pombe* no se han identificado homólogos de XRCC4, ni de DNA-PK o Artemis, estando implicadas en el proceso únicamente el complejo Ku70/Ku80, Xlf1, DNA ligasa 4 y SpPolIV (Wilson et al., 1999).

El denominado NHEJ alternativo (alt-NHEJ) o reunión de extremos mediado por microhomología (MMEJ), resuelve las roturas de doble cadena sin necesidad de los factores clásicos de NHEJ: el complejo Ku70/Ku80, XRCC4 y Ligasa IV. En ocasiones conlleva pequeñas deleciones y la necesidad de pequeñas homologías de secuencia en la zona del daño (Ma et al., 2003; Guirouilh-Barbat et al., 2007; Mladenov & Iliakis, 2011; Grabarz et al., 2012). La reparación por MMEJ se produce en una proporción de eventos durante la recombinación V(D)J (Yan et al., 2007) y está asimismo relacionada con procesos cancerígenos (Hartlerode et al., 2009).

5.5 Familia X de DNA polimerasas humanas

La Familia X de DNA polimerasas humanas está formada por 4 miembros: TdT, Pol μ , Pol β y Pol λ . Entre sus características comunes destaca estar implicadas en diferentes procesos de reparación, ser enzimas monoméricos de pequeño tamaño, carentes de actividad exonucleasa 3'→5' y llevar a cabo una síntesis distributiva. Todos los miembros de la familia comparten una organización estructural formada por el *core* tipo Pol β que engloba una región N-terminal (dominio de 8 kDa) y el dominio de polimerización (31 kDa). Éste a su vez está formado por los dominios *dedos*, *palma* y *pulgar*. Algunos de los miembros de esta familia poseen además dominios adicionales implicados en diferentes funciones (**Figura 6**) (Prasad et al., 1994; Ruiz et al., 2001; Bebenek et al., 2003).

5.5.1 TdT

La Desoxirribonucleotidil Transferasa Terminal (TdT) identificada en 1960, fue la primera DNA polimerasa descrita capaz de llevar a cabo una síntesis independiente de molde, únicamente sobre moléculas de DNA de cadena sencilla con un extremo 3'OH (Bollum, 1960; Kato et al., 1967). Comparte apenas un 22% de identidad de secuencia con Pol β , primer miembro de la Familia X

identificado. Además de su núcleo catalítico tipo Pol β , posee dominios adicionales como el dominio BRCT identificado por primera vez en la proteína BRCA1 e implicado en interacciones proteína-proteína y proteína-DNA (Bork et al., 1997; Callebaut et al., 1997) y una secuencia de localización nuclear (NLS) (**Figura 6**) (revisado por Moon et al., 2007). Al igual que Pol μ posee el denominado Loop 1 que le permite llevar a cabo una síntesis independiente de molde como se observa en su estructura cristalográfica (Delarue et al., 2002). Se caracteriza a su vez, por ser capaz de incorporar tanto dNTPs (2'H) como rNTPs (2'OH) (Roychoudhury, 1972; Boulé et al., 2001) y nucleósidos trifosfato no naturales (Semizarov et al., 1997; Krayevsky et al., 2000). La expresión de TdT se encuentra restringida a órganos linfoides primarios como el timo o la médula ósea, en los que se produce el reordenamiento de los genes de las inmunoglobulinas (células B) y del receptor TCR (células T) mediante la recombinación V(D)J. El primer paso de este mecanismo es la generación de DSBs por endonucleasas del tejido linfóide en secuencias específicas de recombinación. Posteriormente se recluta la maquinaria de reparación por NHEJ (Lieber et al., 2003) y se generan extremos de DNA de cadena sencilla. TdT, reclutada por el complejo Ku, es capaz de utilizar estos extremos de banda simple para llevar a cabo la adición "N" (no dirigida por molde) generando variabilidad antigénica en el repertorio de receptores. El papel de TdT fue demostrado *in vivo* gracias al estudio en ratones deficientes en esta polimerasa (Komori et al., 1993).

5.5.2 Pol μ

Pol μ fue identificada junto a Pol λ en el laboratorio del Dr. Luis Blanco (Domínguez et al., 2000a). Comparte un 42% de homología con TdT, el miembro más cercano de la Familia X. Ambas presentan una organización estructural parecida, con un dominio N-terminal BRCT y una secuencia de localización nuclear (NLS) (**Figura 6**).

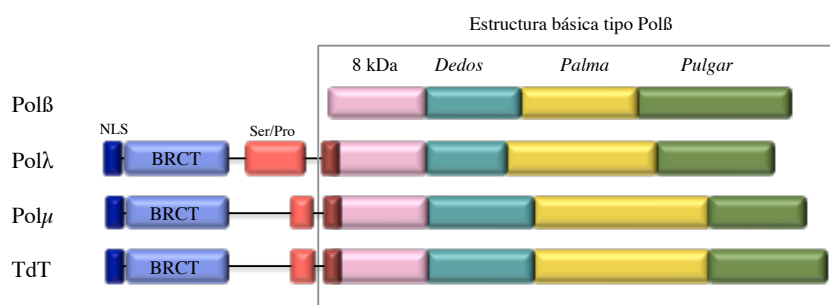


Figura 6. Organización estructural de las DNA polimerasas de la Familia X humana. Sobre la estructura básica de Pol β (dominio de 8 kDa y dominio de polimerización formado por los subdominios *dedos*, *palma* y *pulgar*) se detallan dominios adicionales presentes en cada caso (dominio rico en Ser/Pro, secuencia de localización nuclear "NLS", y dominio BRCT).

Propiedades bioquímicas

Pol μ se caracteriza por poseer cierta actividad transferasa terminal aunque su polimerización es principalmente dependiente de molde (Domínguez et al., 2000; Ruiz et al., 2001). Carece de actividad dRP liasa y presenta una baja fidelidad debido a su capacidad de dislocación, es decir, a que su capacidad de polimerizar usando como molde bases adyacentes alejadas del extremo del iniciador (Zhang et al., 2001; Ruiz et al., 2004;). Además, es capaz de insertar tanto dNTPs como NTPs, dada su baja discriminación del azúcar (Nick McElhinny et al., 2003; Ruiz et al., 2003) lo que podría suponer una ventaja en aquellas fases del ciclo donde los niveles de dNTPs disminuyen ya que los niveles de NTPs se mantienen altos en todo momento (Bjursell et al., 1980). Esta propiedad le confiere una mayor versatilidad permitiendo en función de la disponibilidad y las necesidades celulares completar de manera fiel determinadas reacciones de NHEJ (Martin et al. 2012).

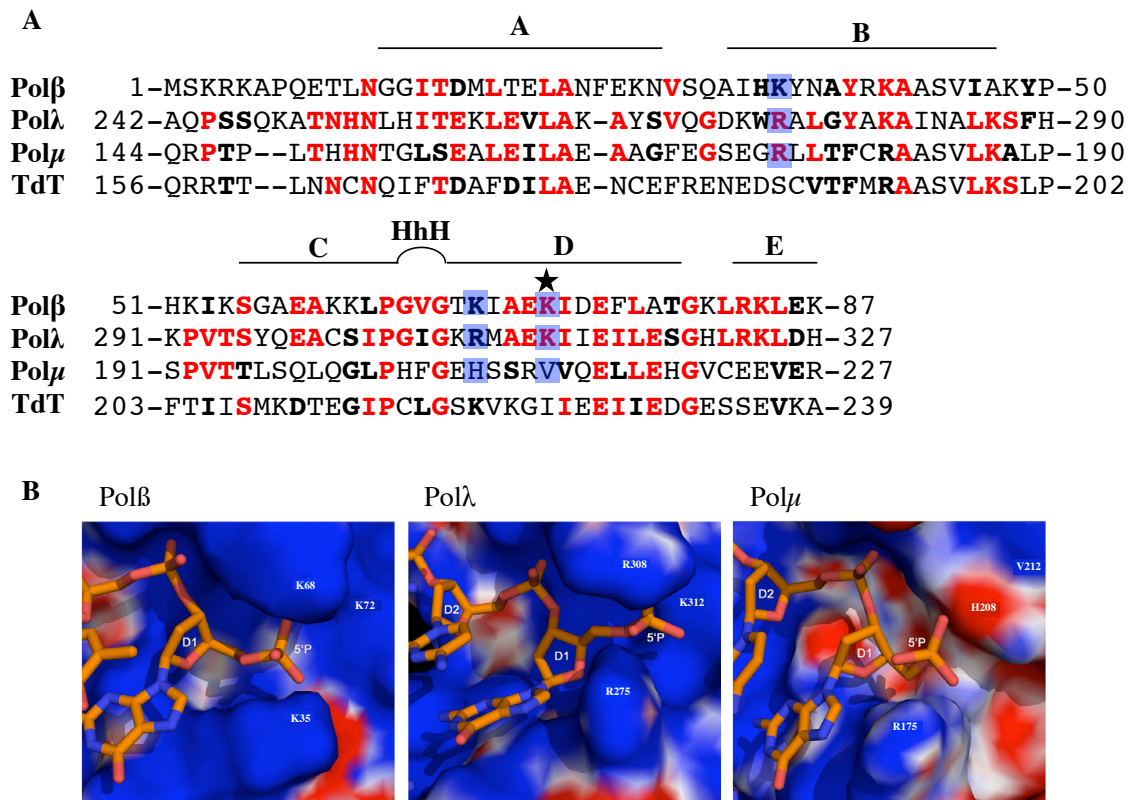


Figura 7. Comparación del dominio de 8 kDa de las polimerasas de la Familia X y detalle del bolsillo de unión al grupo fosfato de Pol β , Pol λ y Pol μ . A. Los aminoácidos de Pol λ idénticos a los de otras DNA polimerasas se indican en rojo. Los conservados se indican en negrita. La numeración se realiza tomando como origen la metionina del extremo N-terminal. Las α -hélices que forman el dominio de Pol λ se nombran (A-E) en la parte superior, así como el motivo HhH entre las hélices C y D. Los residuos de Pol β (K72) y Pol λ (K312) responsables de la actividad dRP liasa se indican con un asterisco. Los residuos implicados en el reconocimiento del grupo fosfato se destacan con un fondo azul. **B.** Detalle de la superficie electrostática del bolsillo de unión al grupo fosfato de Pol β , Pol λ y Pol μ . El DNA se muestra en sticks. (Modificado de Moon et al., 2007).

Organización estructural

La estructura cristalográfica del *core* tipo Pol β de la Pol μ murina ha permitido ahondar en el estudio de las propiedades de esta polimerasa (Moon et al., 2007). En complejo ternario con un *gap* de DNA con un extremo 5'P y el nucleótido entrante, el plegamiento general no difiere del resto de polimerasas de esta familia, presentando una conformación cerrada. Sin embargo, encontramos algunas particularidades como el menor número de interacciones con la zona del molde. Además Pol μ posee entre las láminas $\beta 3$ y $\beta 4$ un Loop 1 mucho mayor que el de Pol λ , cuyo papel es determinante para la actividad transferasa terminal del enzima actuando como pseudo-molde. La pérdida del Loop 1 disminuye la capacidad de Pol μ de polimerizar de forma independiente de molde, aumentando la síntesis dirigida por molde (Juárez et al., 2006). Cabe destacar que los contactos entre los dominios *dedos* y *palma* con la zona del iniciador son mayores que en el caso de Pol λ . Por su parte, el dominio de 8 kDa interacciona con la el grupo 5'P aunque el número de contactos es menor que en Pol λ y Pol β , dado que el bolsillo de unión está menos cargado positivamente (**Figura 7B**). Por último el dominio BRCT juega un papel muy importante en la función de Pol μ mediando su interacción con los factores de NHEJ. Estudios recientes han demostrado además que Pol μ se une al DNA mediante interacciones por este dominio (Martin et al., 2012). La ausencia del BRCT supone una disminución en la capacidad de unión al DNA y en su actividad en la reparación por NHEJ.

Funciones propuestas para Pol μ

La expresión de Pol μ es ubicua aunque preferencial en centros germinales de los órganos linfoides secundarios (Domínguez et al., 2000a) lo que apoya una función de esta polimerasa en la diversificación del sistema inmune (Ruiz et al., 2001). Participa en la recombinación de los genes V y J de la cadena ligera k de las inmunoglobulinas durante la maduración de las células B en la médula ósea (Bertocci et al., 2002a). Pol μ participa también en respuesta a las DSBs mediante el mecanismo de NHEJ. Se ha demostrado su interacción con los factores implicados en el proceso (Mahajan et al., 2002a) y su capacidad de reparar las roturas tanto complementarias como aquellas cuyos extremos no son compatibles (Nick McElhinny et al., 2005; Davis et al., 2008). El control de su actividad transferasa terminal es además muy importante para el balance entre la precisión y la eficiencia en los procesos de NHEJ (Andrade et al., 2009). Recientemente se ha descrito la capacidad de Pol μ de producir expansiones de DNA en secuencias repetidas, lo que podría suponer un aumento en la inestabilidad genómica causada por Pol μ y su implicación en procesos tumorales y neurodegenerativos (Aza et al., 2013).

5.5.3 Pol β

Pol β es la polimerasa más pequeña descrita en mamíferos (39 kDa). Fue el primer miembro de la Familia X identificado por lo que sirve como modelo para el estudio de esta familia. Gracias a gran cantidad de datos bioquímicos y estructurales disponibles hasta la fecha, Pol β ha sido implicada en

numeroso procesos celulares que requieren la síntesis de pequeños fragmentos de DNA (revisado por Beard et al., 2000; Idriss et al., 2002).

Propiedades bioquímicas

Pol β , cuya actividad catalítica reside en el dominio de polimerización (31 kDa), lleva a cabo una síntesis dependiente de molde, mediante el mecanismo basado en dos iones metálicos (T. a Steitz, 1999a). Su síntesis es distributiva en moléculas tipo molde/iniciador abierto (Abbotts et al., 1988) pasando a ser procesiva en presencia de sustratos tipo *gap* de pequeño tamaño (Singhal et al., 1993), que posean un grupo fosfato en su extremos 5'. Al carecer de actividad exonucleasa, su fidelidad de síntesis es muy inferior a la de las polimerasas replicativas, con una frecuencia de error en sustitución de bases de 10^{-3} - 10^{-4} (Kunkel, 1985; Ahn et al., 1997). Su síntesis distributiva hace aumentar su propensión a cometer errores de delección mediada por deslizamiento (Werneburg et al., 1996). Sin embargo, en *gaps* de pequeño tamaño, sustrato idóneo para esta polimerasa, su fidelidad se ve aumentada (Chagovetz et al., 1997; Osheroff et al., 1999).

Organización estructural

El dominio de polimerización de Pol β (31 kDa) formado por los dominios *dedos*, *palma* y *pulgar*, se encuentra unido al dominio N-terminal de 8 kDa donde reside la actividad dRP liasa por una región sensible a proteasas (Prasad et al., 1998). Los estudios estructurales de Pol β como apoenzima y formando complejo binario con el DNA o ternario con el DNA y el nucleótido entrante permiten conocer los detalles del mecanismo de polimerización. En ausencia de DNA, Pol β se encuentra en una conformación “abierta” donde el dominio de 8 kDa está alejado del dominio de polimerización (**Figura 8** izquierda). Esta disposición de la proteína la encontramos también en presencia de DNA tipo molde/iniciador, sin que se produzcan interacciones entre el DNA y el dominio de 8 kDa (H Pelletier et al., 1994). Sin embargo, cuando el sustrato de DNA es un *gap*, este dominio se pliega uniendo el grupo fosfato del extremo 5' (5'P) y estableciéndose contactos entre el dominio de 8 kDa y el dominio *pulgar*, lo que afianza la unión al DNA (Pelletier et al., 1996; Sawaya et al., 1997) (**Figura 8** centro). La unión del nucleótido provoca un cambio conformacional en el subdominio *pulgar*, dando lugar a una conformación “cerrada” de la proteína y favoreciendo las interacciones necesarias para que la catálisis tenga lugar (Sawaya et al., 1997) (**Figura 8** derecha). Entre las interacciones del complejo ternario destaca también la interacción del subdominio *dedos* a través de un motivo “hélice-giro-hélice” (HhH; Doherty et al., 1996) con la zona del iniciador, contribuyendo al cierre del sitio de unión al nucleótido. Tras la catálisis, se produce un nuevo cambio conformacional recuperando la posición “abierta” y facilitando la liberación del pirofosfato (H Pelletier et al., 1996).

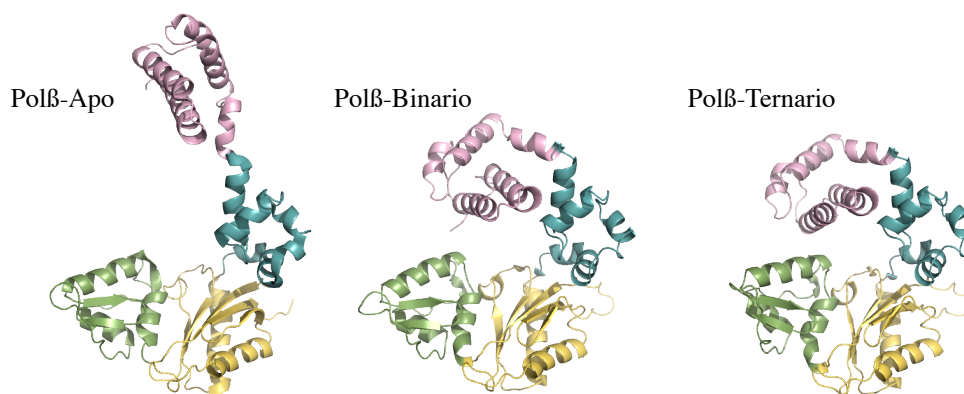


Figura 8. Cambios estructurales de Polβ. Estructuras cristalográfica de las tres conformaciones de Polβ: apoenzima (PDB id 1BPD), complejo binario E:DNA (PDB id 1BPX) y complejo ternario E:DNA:dNTP (PDB id 1BPY). Los dominios se especifican en los siguientes colores: 8 kDa en rosa, *dedos* en turquesa, *palma* en amarillo y *pulgar* en verde.

El ya mencionado dominio de 8 kDa, juega un papel muy importante en las funciones propuestas para Polβ. En él reside la actividad dRP liasa, encargada de eliminar el residuo dRP generado durante la reparación por escisión de bases (BER; ver apartado 5.3). El proceso ocurre de forma independiente de metal mediante β-eliminación a través de un intermediario en forma de base de Schiff. Se ha propuesto que en esta región existe además otra actividad, AP-liasa, que siendo 200 veces menos eficiente, produciría la incisión de la cadena de DNA en el extremos 3' del sitio abásico (Prasad et al., 1998). Además, el dominio de 8 kDa, a través de un motivo HhH y del bolsillo de unión a grupos fosfato se une al DNA y al grupo 5'P respectivamente (**Figura 7**) (Doherty, 1996; Prasad et al., 1994). Por último, Polβ es regulada post-traduccionamente por acetilación de este dominio. Esto provoca una disminución de su actividad dRP liasa sin alterar las actividades polimerasa y AP-liasa. Esta regulación podría hacer la ruta de reparación de BER fuese de trecho largo en lugar de corto, al no poder ser eliminado el residuo dRP (Hasan et al., 2002).

Funciones propuestas para Polβ

A parte de su ya mencionado papel en el mecanismo de BER, Polβ está también implicada en la reparación por NER (Horton et al., 1995; Canitrot et al., 2000), en replicación (Sweasy et al., 1992), en recombinación (Nowak et al., 1990), en meiosis (Plug et al., 1997) y en fenómenos de neurogénesis, ya que los ratones carentes de esta polimerasa muestran altos niveles de apoptosis en neuronas postmitóticas del sistema nervioso central y periférico en desarrollo y mueren al poco tiempo de nacer (Sugo et al., 2000).

5.5.4 Polλ

Polλ es el miembro que guarda mayor identidad de secuencia con Polβ, un 32% en la región del *core* (García-Díaz et al., 2000; Aoufouchi et al., 2000; Nagasawa et al., 2000). Presentan una

organización estructural similar aunque Pol λ posee dominios adicionales como el dominio (BRCT) (**Figura 6**).

Propiedades bioquímicas

Pol λ es una enzima dependiente de molde que lleva a cabo una síntesis distributiva en moléculas tipos molde/iniciador. Sin embargo, al igual que ocurre con Pol β , su síntesis se vuelve procesiva en moléculas tipo *gap* de unos pocos nucleótidos con un extremos 5'P (García-Díaz et al., 2002). Su alta afinidad por el nucleótido (baja Km) le permite llevar a cabo sus funciones incluso cuando la disponibilidad del nucleótido es baja. Posee una baja discriminación a nivel de la posición 3' del azúcar, insertando tanto dNTPs (3'OH) como ddNTPs (3'H) (García-Díaz et al., 2002). Sin embargo, si que es capaz de discriminar entre dNTPs y rNTPs, no utilizando los últimos durante la catálisis. Pol λ es una de las polimerasas con mayor tasa de error, incluso por delante de las polimerasas de la Familia Y consideradas mutagénicas. Su tasa de error de deleciones de una base es mayor que la tasa de error de sustitución de bases (Bebenek & Kunkel, 2003; Bebenek et al., 2003); es muy eficiente extendiendo apareamientos erróneos y apareamientos con bases modificadas (Picher et al., 2006; Picher et al., 2007). Las estructuras disponibles muestran cómo es capaz de acomodar en centro activo sustratos de DNA con este tipo de modificaciones permaneciendo su estructura global prácticamente inalterada (**Figura 9**). Pol λ es además capaz de estabilizar bases extra-helicoidales en la cadena molde (García-Díaz et al., 2006).

Organización estructural

El estudio estructural de Pol λ demuestra que al contrario de lo que ocurre con Pol β , Pol λ mantiene a lo largo de su ciclo catalítico una conformación cerrada (García-Díaz et al., 2005). Además del dominio de polimerización *core* tipo Pol β , Pol λ posee dominios adicionales N-terminales: el dominio BRCT y una región rica en Ser-Pro. Ambos dominios son dispensables para la catálisis (Nagasawa et al., 2000; García-Díaz et al., 2004). Al igual que en el caso de Pol β , en el dominio de 8 kDa de Pol λ reside su actividad dRP liasa (García-Díaz et al., 2001) y conserva a su vez los residuos implicados en la unión a grupos fosfato y el motivo HhH (García-Díaz et al., 2002; Moon et al., 2007) (**Figura 7**). En la estructura de Pol λ encontramos dos particularidades: el mini Loop 1, situado el dominio *palma* entre las láminas β 3 y 4 y relacionado con su fidelidad (Bebenek et al., 2010) y un *loop* ausente en las otras polimerasas de la Familia X situado el dominio *pulgar* entre las láminas β 7 y 8 y con capacidad de unión al DNA (García-Díaz et al., 2006). La gran disponibilidad de estructuras cristalográficas nos permiten entender algunas de las propiedades bioquímicas antes mencionadas como la capacidad de extender apareamientos erróneos (García-Díaz et al., 2004; García-Díaz et al., 2005; García-Díaz et al., 2009).

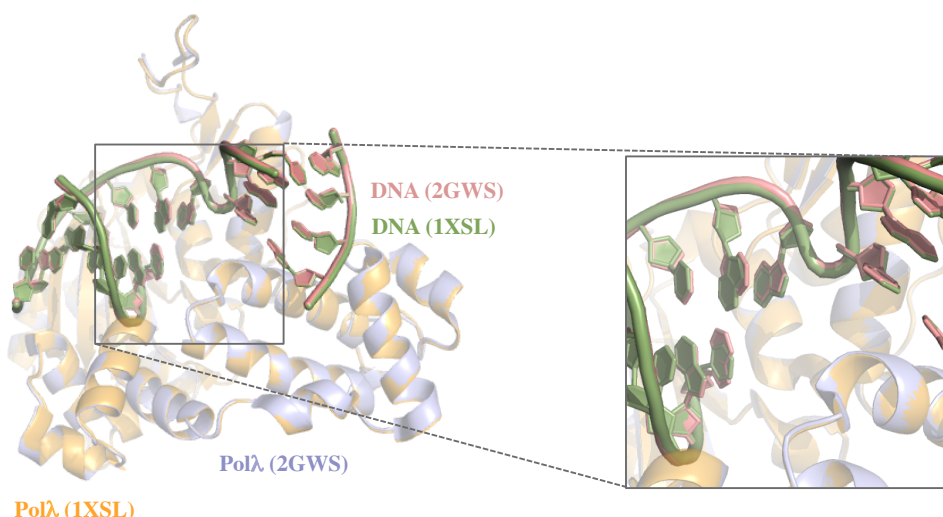


Figura 9. Estructura de Polλ en *gap* de un nucleótido. En naranja se muestra la estructura de Polλ en complejo binario con el extremo del iniciador correctamente apareado (PDB id 1XSL). En azul se muestra la estructura de Polλ en complejo binario con un par incorrecto dG:dG (PDB id 2GWS). El DNA se muestra en verde y rosa respectivamente. En el detalle se observa el cambio en la estructura del DNA debido al apareamiento erróneo.

Funciones propuestas para Polλ

Dada la expresión predominante de Polλ en testículo, se propuso una función en los procesos de reparación asociados a meiosis durante la espermatogénesis. Su expresión está regulada en el tiempo y el espacio, llegando a su máximo en los espermatoцитos en fase Paquitene tardía, momento de la recombinación meiótica (García-Díaz et al., 2000). Participa en la ruta de reparación por BER gracias a su actividad dRP liasa demostrándose su implicación en este proceso *in vivo* (Braithwaite et al., 2005; Braithwaite et al., 2005b). Además, la presencia del dominio BRCT y su abundante expresión en testículo donde ocurren procesos de reparación por BER (Intano et al., 2001; Olsen et al., 2001) avaló la hipótesis de que podría estar relacionada con otros procesos de reparación no accesibles a Polβ (García-Díaz et al., 2001). Por otro lado, la interacción entre Polλ y PCNA (Maga et al., 2002; Shimazaki et al., 2002), la ha relacionado con otros procesos de reparación y tolerancia al daño. Así, en los últimos años se ha descrito la capacidad de Polλ de sintetizar DNA a través de sitios abásicos en presencia de PCNA (Maga et al., 2002), pero sobre todo su capacidad de tolerar bases modificadas como 8oxoG (Picher et al., 2007) en el DNA. Su interacción con la glicosilasa MutY (van Loon et al., 2009) y el aumento de la fidelidad de copia de la base 8oxoG en presencia de PCNA y RPA (Maga et al., 2008), sugieren un importante papel *in vivo* en tolerancia/reparación de esta lesión. Su propensión a cometer errores de delección y su capacidad de utilizar sustratos de DNA con imperfecciones hicieron pensar en un papel de Polλ en reparación de DSBs. Su implicación directa en NHEJ ha sido descrita en los últimos años (Lee et al., 2004; Ma et al., 2004; Nick McElhinny et al., 2005; Lieber, 2010; Ramsden, 2011). Por último, Polλ participa en la generación de variabilidad de los anticuerpos junto con Polμ y TdT sin ser sus funciones redundantes (Bertocci et al., 2006).

La delección de los exones 5-7 del gen de Pol λ en ratones llevado a cabo por Bertocci y colaboradores (Bertocci et al., 2002b) eliminó el sitio activo de Pol λ y el primer dominio hélice-giro-hélice eliminando a su vez la actividad dRP liasa. El ratón *knockout* para Pol λ es viable y fértil. Sin embargo, presenta un reordenamiento defectuoso de la cadena pesada de las inmunoglobulinas mientras que no se ve alterado el reordenamiento de la cadena ligera (Bertocci et al., 2006). Por tanto, estos estudios sugieren que al contrario de lo que ocurre con Pol β (Sugo et al., 2000), Pol λ es dispensable para el desarrollo embrionario normal aunque juega un papel importante en los procesos de recombinación V(D)J (revisado por Menezes & Sweasy, 2012).

5.5.5 Evolución de los miembros de la Familia X de DNA polimerasas

Los miembros de la Familia X están presentes en todos los taxones monofiléticos: *Eukaria*, *Bacteria* y *Archea*; incluso en virus cuyo genoma es DNA (Oliveros et al., 1997). El alto grado de conservación a nivel de estructura primaria y tridimensional parece indicar su evolución a partir de un ancestro común. A diferencia de lo que ocurre en virus, procariotas y levaduras, los eucariotas superiores poseen más de un miembro de la Familia X. Sin embargo, existen especies en las que no se ha descrito ningún miembro de esta familia, como los organismos modelo *Caenorhabditis elegans* y *Drosophila melanogaster* (Burgers et al., 2001). En levaduras existe una única polimerasa de esta familia, Pol4. Tanto Pol4 de *S. cerevisiae* (ScPol4) como de *S. pombe* (SpPol4) poseen, a parte del *core* tipo Pol β , dominios adicionales como BRCT y el dominio Ser/Pro y ambas poseen actividad dRP-liasa (Bebenek et al., 2005; González-Barrera et al., 2005). Basándonos en la identidad de secuencia podemos decir que ScPol4 es el ortólogo de Pol λ en humanos (24% de identidad de secuencia) y SpPol4 es el ortólogo de Pol μ (27% de identidad de secuencia).

La similitud de secuencia entre Pol λ y Pol4 de levaduras así como con sus versiones de plantas (*Arabidopsis thaliana*), sugiere que Pol λ es el miembro más cercano al ancestro común de la Familia X (**Figura 10**). Su diversidad de funciones concuerda con los diferentes mecanismos de síntesis de DNA que llevaría a cabo la polimerasa ancestral. Además, la presencia del dominio Ser/Pro permite la regulación de Pol λ en procesos como BER, NHEJ y la recombinación V(D)J. A partir de ese ancestro común la Familia X se ha especializado en diferentes procesos asociados con la reparación del DNA. Destaca así el mecanismo de reparación por escisión de bases (BER) llevada a cabo por Pol β (aunque Pol λ participa en determinadas situaciones); la reparación de DSBs por NHEJ llevada a cabo por Pol λ y Pol μ en función del tipo de rotura generado y por último la recombinación V(D)J llevada a cabo por Pol λ , Pol μ y TdT, con funciones no redundantes. La especialización a lo largo de la evolución, con ganancia y pérdida de diferentes dominios y funciones, dota a cada una de estas polimerasas de una gran eficiencia en los procesos biológicos en los que participa.

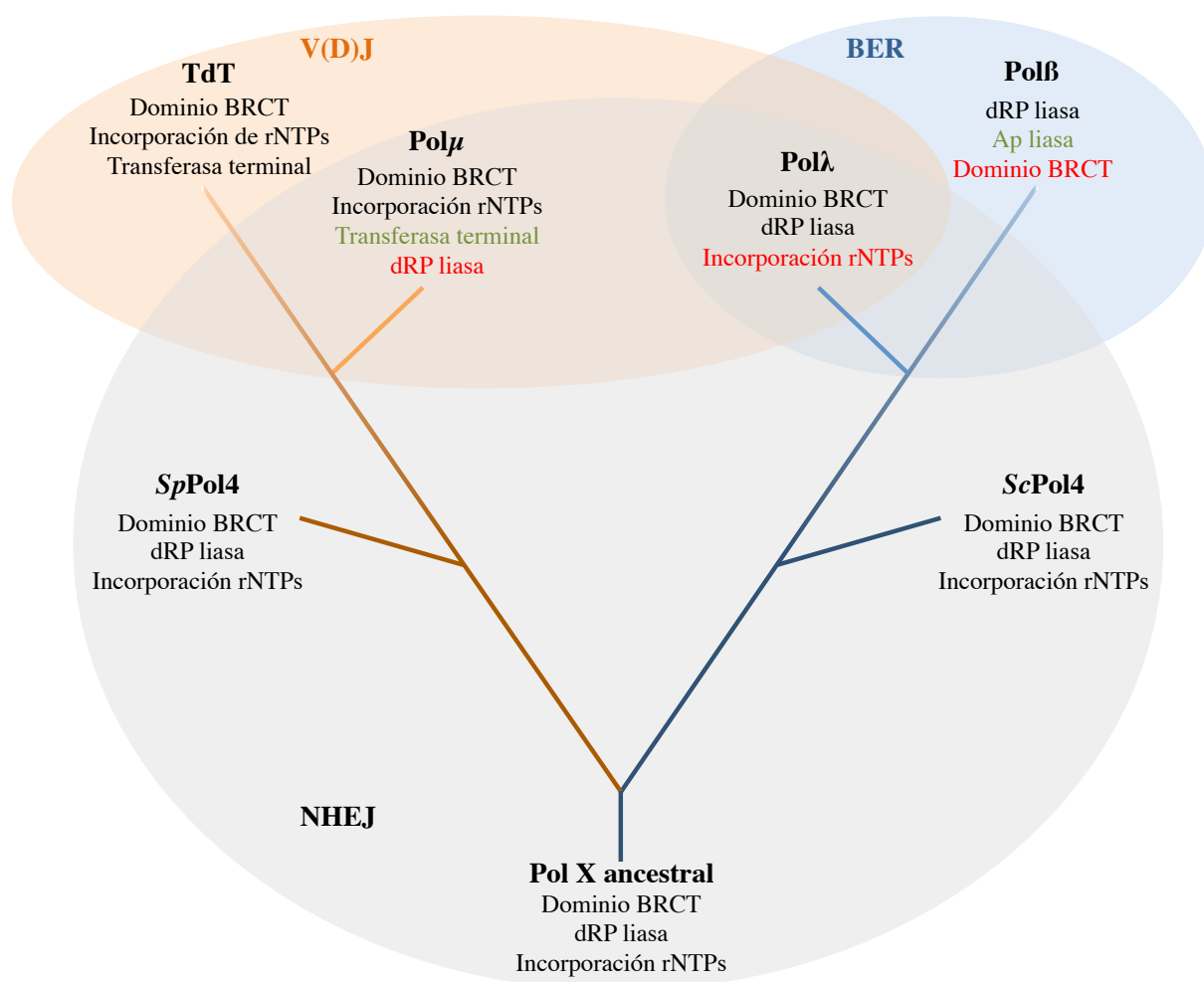


Figura 10. Evolución de las DNA polimerasas de la Familia X. En rojo se destacan las pérdidas de función o dominios. En verde las ganancias de actividad.

Polλ como miembro más antiguo de la familia, posee el dominio BRCT necesario para la interacción con los factores de NHEJ, pero también posee actividad dRP-liasa necesaria para una reparación eficiente por BER. Polβ es el miembro más reciente de esta familia. Ha perdido gran cantidad de dominios como el BRCT o el dominio Ser/Pro. Sin embargo, se ha especializado en la reparación por BER aumentando sus contactos con el grupo 5'P del DNA y adquiriendo las actividades dRP-liasa y AP-liasa. Aunque la rama de Polμ y TdT aparece en el árbol filogenético mucho antes que Polβ, la adquisición de la actividad transferasa terminal aparece en la evolución más reciente, coincidiendo con el desarrollo de la recombinación V(D)J en mamíferos. A pesar de su homología de secuencia y de compartir algunas características bioquímicas y estructurales, Polμ está especializada en la reparación por NHEJ mientras que la función de TdT se limita a la generación de variabilidad durante el desarrollo del sistema inmune.

Sutiles diferencias bioquímicas y estructurales podrían ser cruciales a la hora de desempeñar sus funciones celulares. Las particularidades de Pol λ que hacen Pol λ y Pol μ , ambas implicadas en NHEJ no tengan funciones redundantes y que Pol λ y Pol β , tan próximas evolutivamente sean tan diferentes funcionalmente han sido el principal objeto de estudio de esta Tesis Doctoral.

OBJETIVOS

1. Análisis de la función de Pol λ en la reparación de roturas de doble cadena (DSBs) mediante la reunión de extremos no homólogos (NHEJ) en ausencia de factores auxiliares. Un primer objetivo fue ahondar en la habilidad de Pol λ de reunir extremos de DNA no homólogos, analizando la importancia de la secuencia que flanquea la rotura y la distancia existente entre ambos *gaps*. Además nos planteamos estudiar la capacidad de Pol λ de reparar roturas cuando los extremos presentan discontinuidades, bases extra o daño oxidativo como la base modificada 8oxoG.
2. Estudio de la función de la región del “*nail*” de Pol λ . Mediante la construcción y purificación de una proteína quimérica donde intercambiamos la región del *nail* de Pol λ por la de Pol μ (Pol λ (Nail μ)), nos planteamos determinar la importancia de esta región para la tolerancia de bases extra-helicoidales en los sustratos de DNA, así como su relevancia en la reparación por NHEJ.
3. Importancia del Loop 1 de Pol λ en su especificidad en NHEJ. Mediante la obtención de la proteína quimérica Pol λ (Loop1 μ) (donde intercambiamos el Loop 1 de Pol λ por el de Pol μ), y el análisis del mutante Pol λ -DL (Pol λ sin Loop 1; suministrado por la Dra. Kataryzna Bebenek NIEHS, USA), nos planteamos estudiar la importancia del Loop 1 en las reacciones de NHEJ.
4. Relevancia de la región del “*broche*” de Pol λ (WVCAQ). Entre el dominio BRCT y el *core* tipo Pol β existe en Pol λ (WVCAQ) y en Pol μ y TdT (YACQR) una región conservada, potencialmente implicada en el mantenimiento de la conformación cerrada de estas polimerasas. Nos planteamos estudiar el *broche* de Pol λ mediante mutagénesis dirigida y determinar su importancia en el relleno de *gaps* largos y en la reparación de roturas por NHEJ.
5. Análisis del dominio BRCT de Pol λ . Para estudiar la relevancia del BRCT de Pol λ en las reacciones de NHEJ nos planteamos obtener dos proteínas quiméricas: la primera de ellas con el BRCT de Pol μ y la región del *core* de Pol λ [Pol λ (BRCT μ)]; en la segunda, además del BRCT de Pol μ se intercambiaría también la región del *broche* de Pol λ por el de Pol μ [Pol λ (BRCT μ +YACQR μ)].
6. Caracterización bioquímica de polimorfismos simples naturales (SNP) de Pol λ y de isoformas relacionadas con diferentes tipos de cáncer. Este objetivo se llevó a cabo mediante mutagénesis dirigida, análisis bioquímico de las variantes seleccionadas y predicción de posibles cambios estructurales mediante modelado molecular.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES

1.1 Enzimas

La polinucleótido quinasa de T4 (T4 PNK) se adquirió en *England Biolabs*; la *Pfu* DNA polimerasa se obtuvo de *Promega*; el fragmento *Klenow* de la Pol I de *E. coli* fue adquirido de *Roche*; la hAPE y la UDG glicosilasa fueron cedidas por el Dr. Ángel Picher (Xpol Biotech S.L.). La Pol λ fue purificada como se describe más adelante y la Pol μ humana purificada se obtuvo como se describió anteriormente (Domínguez et al., 2000a).

1.2 Reactivos

Las sales inorgánicas, ácidos, bases y compuestos orgánicos, fueron suministrados por *Merck*, *Sigma* y *Fluka*.

1.3 Nucleótidos

Se utilizaron dNTPs y ddNTPs ultrapuros no marcados adquiridos en *Amersham Biosciences* y los nucleótidos marcados radioactivamente; [γ - 32 P]ATP, [α - 32 P]dCTP (3000 Ci/mmol) adquiridos en *Perkin Elmer*. Los oligonucleótidos sintéticos fueron obtenidos de *Invitrogen* y *Sigma*. Los oligonucleótidos usados durante los procesos de mutagénesis dirigida y para generar sustratos de DNA para los ensayos bioquímicos se muestran en la **tabla 2** y en la **tabla 3** respectivamente.

2. MÉTODOS

2.1 Búsqueda de variantes polimórficas simples de hPol λ , análisis comparativo de secuencias y estudio estructural de residuos y motivos de las polimerasas de la Familia X

La búsqueda de las variantes polimórficas de hPol λ se realizó en la base de datos <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>. El análisis comparativo de secuencias se realizó alineando la secuencia de hPol λ con las secuencias de esta polimerasa de diferentes organismos, así como con secuencias de otras polimerasas de la Familia X, mediante el paquete informático Multalin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>). El estudio estructural de los diferentes residuos y motivos de hPol λ y de otras polimerasas de la Familia X, se realizó mediante el programa MacPyMOL (<http://delsci.com/macpymol/>). La predicción de la estructura de proteínas quiméricas hPol λ -hPol μ se realizó mediante el modelado sobre estructuras conocidas usando el paquete informático SwissModel (<http://swissmodel.expasy.org/workspace>).

2.2 Clonaje y mutagénesis dirigida

2.2.1 Mutagénesis dirigida para la obtención de variantes polimórficas y de mutantes puntuales de hPol λ

Mediante mutagénesis dirigida sobre la construcción pET22b-hPol λ se obtuvieron las construcciones con el cDNA de las variantes polimórficas de hPol λ (R57W, T221P, T221S, S222F, T458R, S463T y R487W), así como de mutantes puntuales de interés (W239Y, W239G, C241S, C241G, Q243R, Q243G, S245T, S245G). Los oligonucleótidos empleados se muestran en la **Tabla 2**. El producto de amplificación por PCR (95 °C, 1 min; 55 °C, 1 min; 72 °C, 14 min) fue digerido durante 1h a 37 °C con DpnI. A continuación se transformó el producto final en la cepa de *E. coli* DH5 α y se comprobó que no existían errores de secuencia mediante secuenciación. Posteriormente, se transformaron las construcciones en la cepa de expresión de *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-pRIL.

2.2.2 Construcción de los vectores de expresión de *E. coli* que codifican para proteínas quiméricas hPol λ -hPol μ

pET22b-hPol λ (Nail μ), *pET22b-hPol λ (Loop1 μ)* y *pET22b-hPol λ (Loop1 μ +Nail μ)*

La obtención de las construcciones pET22b-hPol λ (Nail μ) y pET22b-hPol λ (Loop1 μ) se realizó mediante mutagénesis directa por recombinación homóloga (Malcom 1999) sobre el plásmido pET22b-hPol λ . Este protocolo de PCR en dos pasos permite introducir delecciones de un modo muy eficiente (Malcom, 1999). En una primera ronda de amplificación de 10 ciclos (95 °C, 1 min; 50 °C, 1 min; 72 °C 30 s) se realizó una PCR con cada uno de los oligonucleótidos por separado (*sense* y *antisense* para cada una de las quimeras, **Tabla 2**). Posteriormente, en la segunda ronda de amplificación se mezclaron cantidades equimolares de los productos de la primera ronda durante 20 ciclos más (95 °C, 1 min; 60 °C, 1,5 min; 72 °C, 14 min). El producto final se digirió con DpnI durante 1h a 37 °C y se transformó en la cepa de *E. coli* DH5 α y se comprobó que no existían errores de secuencia mediante secuenciación. Posteriormente, se transformaron las construcciones en la cepa de expresión de *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-pRIL. Para la obtención de la construcción de la quimera doble pET22b-hPol λ (Loop1 μ +Nail μ) se llevó a cabo el mismo procedimiento descrito partiendo de la construcción pET22b- hPol λ (Nail μ).

pET22b-hPol λ (BRCT+YACQR μ) y *pET22b-hPol λ (BRCT μ)*

Para la obtención de la construcción pET22b-hPol λ (BRCT+YACQR μ) se llevaron a cabo dos reacciones de PCR consecutivas. En la primera de ellas (95 °C, 1 min; 66 °C, 1 min; 72 °C, 1 min) se partió de la construcción pRSETA-hPol μ (Domínguez et al., 2000b) para obtener un producto de amplificación que codificara para la región del BRCT+YACQR de hPol μ . Los oligonucleótidos utilizados se muestran en la **Tabla 2**. En la segunda PCR (95 °C, 1 min; 60 °C, 1,5 min; 72 °C, 14 min) partiendo de la construcción pET22b-hPol λ core (Garcia-Diaz et al., 2004) se utilizó el producto de

amplificación de la primera como *megaprimer*. Para la obtención de la construcción pET22b-hPol λ (BRCT μ) se partió de la obtenida anteriormente y mediante mutagénesis dirigida (95 °C, 1 min; 66 °C, 1 min; 72 °C, 1 min) utilizando los oligonucleótidos que se muestran el **Tabla 2**, se obtuvo la construcción donde se han sustituido los 5 aminoácidos YACQR (hPol μ) por WVCAQ (hPol λ). Los productos finales se digirieron con DpnI durante 1h a 37 °C, se transformaron en la cepa de *E. coli* DH5 α y se comprobó que no existían errores de secuencia mediante secuenciación. Posteriormente, se transformaron las construcciones en la cepa de expresión de *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-pRIL.

2.3 Sobre-expresión y purificación de proteínas

2.3.1 Sobre-expresión y purificación de la DNA polimerasa humana Pol λ y sus polimorfismos simples (R57W, T221P, T221S, S222F, T458R, S463T y R487W)

Para sobre-expresar tanto la proteína *wild-type* como sus polimorfismos simples, se transformaron los vectores con las construcciones correspondientes en la cepa de expresión de *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-pRIL (Stratagene), que contiene copias adicionales de los genes de tARN argU, ileY y leuW para facilitar la expresión en *E. coli* de proteínas eucarióticas. Las células transformadas con el plásmido de expresión se crecieron en medio LB (100 μ g/ml ampicilina, 34 μ g/ml cloranfenicol) a 28 °C. La expresión de las proteínas se llevó a cabo induciendo en fase de crecimiento exponencial (D.O._{600nm} 0,6) con 1 mM IPTG durante 4-5h. Posteriormente se recogieron las células, se pesaron y guardaron a -20 °C.

La lisis tuvo lugar en 4 volúmenes de Tampón A (50 mM Tris HCl, pH 7,5; 1 mM EDTA; 1 mM DTT; 10% glicerol) 1 M NaCl mediante sonicación al 50% de amplitud durante 10 pulsos de 1 minutos dejando enfriar la muestra en hielo/agua durante 2 min entre pulso y pulso. Los restos celulares y células no lisadas se sedimentaron por centrifugación (3.000 r.p.m. 5 min, 4 °C), así como el material insoluble (11.000 r.p.m. 20 min, 4 °C). Se precipitó el DNA con polietilenimina (PEI; conservada en solución al 10% en agua), y el complejo DNA-PEI se sedimentó por centrifugación (11.000 r.p.m. 20 min, 4 °C). El sobrenadante se diluyó primero hasta una concentración de 500 mM de NaCl con Tampón A (11.000 r.p.m. 20 min, 4 °C) y después hasta 250 mM NaCl (11.000 r.p.m. 20 min, 4 °C). Se precipitaron las proteínas con sulfato amónico al 35% de saturación y se sedimentó el precipitado por centrifugación (11.000 r.p.m. 20 min, 4 °C).

El precipitado de sulfato de amonio se resuspendió en Tampón A, se diluyó en Tampón A hasta 0,2 M NaCl y se filtró. Para los siguientes pasos de purificación se utilizó un Äkta Purifier FPLC system (GE Healthcare). La primera columna utilizada fue una Heparina de 5 ml. Tras pasar la muestra y lavar, se eluyó en gradiente con Tampón A desde 0,2 M NaCl hasta 0,7 M NaCl en 40 volúmenes de columna (CV). Las fracciones que contienen la proteína se juntaron y de diluyeron a 0,2

M NaCl para pasarlas por una MonoS de 1,7 ml. Tras pasar la muestra y lavar, se eluyó en gradiente con Tampón A desde 0,2 M NaCl hasta 0,5 M NaCl en 30 CV. Las fracciones que contienen la proteína se juntaron y diluyeron en Tampón A hasta 0,2 M NaCl para concentrarla en una Heparina de 5 ml. Tras pasar y lavar la muestra se eluyó con Tampón A 1 M NaCl. Las fracciones que contienen la proteína purificada se diluyeron hasta una concentración final de 0,5 M NaCl y 50% de glicerol y se alicuotearon para su almacenamiento a -80 °C. La concentración de proteína se estimó por densitometría de geles de poliacrilamida-SDS teñidos con azul de Coomassie, empleando patrones de concentración conocida.

2.3.2 Sobre-expresión y purificación de los mutantes puntuales del dominio *broche* de hPolλ (W239Y, W239G, C241S, C241G, Q243R, Q243G, S245T, S245G)

Los mutantes puntuales del dominio *broche* de hPolλ fueron sobre-expresados y purificados tal y como se ha descrito en el apartado 2.3.1.

2.3.3 Sobre-expresión y purificación de las proteínas quiméricas hPolλ-hPolμ

Las quimeras hPolλ(Nailμ), hPolλ(BRCTμ) y hPolλ(BRCT+YACQRμ) fueron sobre-expresadas y purificadas tal y como se ha descrito anteriormente. Por problemas de solubilidad, las quimeras hPolλ(Loop1μ) y hPolλ(Loop1μ+Nailμ) fueron sobre-expresadas a 18 °C O/N a una concentración de 0,5 M de IPTG. El resto de la purificación de estas quimeras se llevó a cabo tal y como se describe en el apartado 2.3.1.

2.4 Marcaje e hibridación de los sustratos utilizados en los ensayos *in vitro*

Para los ensayos de polimerización del DNA de retraso en gel y para los ensayos de reunión de extremos no homólogos (NHEJ) se marcaron radioactivamente oligonucleótidos indicados, en su extremo 5' con [γ -³²P]ATP (10 μCi) y T4 PNK (10 u). Tras una incubación a 37 °C durante 45 min, se inactivó la PNK mediante la incubación de la muestra 10 min a 65 °C. Posteriormente el oligonucleótido marcado se hibridó en un proporción 1:3:2 (oligonucleótido marcado: molde: *downstream* en caso de haberlo) con los oligonucleótidos indicados en cada caso en presencia de Tris HCl 50 mM, pH 7,5 y NaCl 0,3 M para formar los diferentes sustratos de DNA. Tras una incubación de 10 min a 80 °C se dejó caer la temperatura hasta alcanzar la temperatura ambiente, favoreciendo así la hibridación de las moléculas de DNA.

2.5 Ensayos de polimerización de DNA

2.5.1 Ensayos de actividad en moléculas tipo molde/iniciador y *gap* de 5 nucleótidos

El oligonucleótido SP1C (**Tabla 3**) se marcó radioactivamente y se hibridó con el oligonucleótido T18 (**Tabla 3**) como se describe en el apartado 2.4, para formar una molécula tipo molde/iniciador, o con el oligonucleótido T18 y Dg5OH y Dg5P (**Tabla 3**) para formar moléculas tipo *gap* de 5 nucleótidos con grupos OH y P respectivamente en el extremo 5' del *gap*.

Las reacciones de polimerización se llevaron a cabo en 20 μ l en presencia de Tris HCl 50 mM, pH 7,5, MgCl₂ 2,5 mM ó 1 mM MnCl₂ según se indique, DTT 1 mM, glicerol 5%, BSA 0,1 mg/ml, 2,5 nM del sustrato marcado, y concentraciones de proteína y nucleótido indicadas en cada caso. Tras una incubación de 20 min a 30 °C, se detuvieron las reacciones añadiendo tampón de carga (formamida 95%, EDTA 10 mM, pH 8, xilencianol 0,1% y azul de bromofenol 0,1%). Los productos se resolvieron y analizaron mediante electroforesis en geles de 20% poliacrilamida-8 M urea y posterior autorradiografía.

2.5.2 Ensayos de fidelidad en moléculas tipo *gap* de un nucleótido

El oligonucleótido SP1C (**Tabla 3**) se marcó radioactivamente y se hibridó con cada una de las variantes del oligonucleótido T13 y con el Dg1P (**Tabla 3**) como se describe en el apartado 2.4, para formar una molécula tipo *gap* de un nucleótido con un grupo P en su extremo 5' y que tiene como base molde cada una de las 4 bases (A, C, G y T).

Las reacciones de polimerización se llevaron a cabo en 20 μ l en presencia de Tris HCl 50 mM, pH 7,5, MgCl₂ 2,5 mM, DTT 1 mM, glicerol 5%, BSA 0,1 mg/ml, 2,5 nM del sustrato marcado, y concentraciones de proteína y nucleótido indicadas en cada caso. Tras una incubación de 20 min a 30 °C, se detuvieron las reacciones añadiendo tampón de carga (formamida 95%, EDTA 10 mM, pH 8, xilencianol 0,1% y azul de bromofenol 0,1%). Los productos se resolvieron y analizaron mediante electroforesis en geles de 20% poliacrilamida-8 M urea y posterior autorradiografía.

2.5.3 Ensayos de polimerización independiente de molde (Transferasa terminal)

El oligonucleótido Poli-dA (**Tabla 3**) se marcó como se describe en el apartado 2.4 y posteriormente se diluyó en Tris HCl 50 mM, pH 7,5 y NaCl 0,3 M hasta una concentración de 100 nM.

La reacción se llevó a cabo en 20 μ l en presencia de Tris HCl 50 mM, pH 7,5, 1 mM MnCl₂, DTT 1 mM, glicerol 5%, BSA 0,1 mg/ml, 2,5 nM del sustrato marcado, 600 nM de proteína y 100 μ M de dNTPs. Tras una incubación de 60 min a 30 °C, se detuvo la reacción añadiendo tampón de carga, se resolvieron y analizaron mediante electroforesis en geles de 20% poliacrilamida-8 M urea y posterior autorradiografía.

2.5.4 Análisis de la capacidad aceptar bases extra-helicoidales en el DNA

El oligonucleótido P-Nail (**Tabla 3**) se marcó radioactivamente y se hibridó con el molde control (T-Nail) y cada uno de los moldes que dejan una base extra-helicoidal en la molécula de DNA (T-2C, T-2A, T-2G, T-2T, T-2CC, T-3C, T-4C, T-6C y T-7C) y con el D-Nail (**Tabla 3**) como se describe en el apartado 2.4, para formar una molécula tipo *gap* de un nucleótido con un grupo P en su extremo 5', con diferentes bases extra-helicoidales y a diferentes distancias de la zona del *gap*.

La reacción se llevó a cabo en 20 μ l en presencia de Tris HCl 50 mM, pH 7,5, 2,5 mM MgCl₂, DTT 1 mM, glicerol 5%, BSA 0,1 mg/ml, 2,5 nM del sustrato marcado y las concentraciones de proteína y dNTPs indicadas en cada caso. Tras una incubación durante el tiempo indicado a 30 °C, se detuvo la reacción añadiendo tampón de carga (formamida 95%, EDTA 10 mM, pH 8, xilencianol 0,1% y azul de bromofenol 0,1%). Los productos se resolvieron y analizaron mediante electroforesis en geles de 20% poliacrilamida-8 M urea y posterior autorradiografía.

2.6 Análisis de la capacidad de unión del DNA mediante ensayos de retraso en gel

El oligonucleótido FP-T (**Tabla 3**) se marcó radioactivamente y se hibridó con el FP-P y el FP- D (**Tabla 3**) como se describe en el apartado 2.4, para formar una molécula tipo *gap* de 1 nucleótido con un grupo P en su extremo 5'.

Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 10 μ l en presencia de 50 mM Tris HCl (pH 7,5), 1 mM DTT, glicerol 5%, 0,1% BSA, 2,5 nM del sustrato marcado y las concentraciones de proteína indicadas en cada caso. Tras una incubación de 15 min a 30 °C, se añadió glicerol hasta una concentración final del 10% y las muestras se sometieron a electroforesis en geles de acrilamida/bis-acrilamida (4% / 0,05%) durante 2 h a 180 V y 4 °C en tampón TBE 0,5X. Posteriormente el gel fue transferido a papel Whatman, secado y revelado por autorradiografía.

2.7 Ensayos de reparación de roturas de doble cadena mediante reunión de extremos no homólogos (NHEJ)

Para este tipo de ensayos se utilizaron dos tipos de moléculas de DNA de doble cadena conteniendo un extremo 3' protuberante. Una de ellas, se encuentra marcada para poder seguir su extensión, por lo que se utilizará como el extremos que aporta la cadena iniciadora. La segunda molécula, cuya protuberancia 3' actuará como molde, no está marcada. Para generar el extremo "iniciador", los oligonucleótidos indicados en cada caso se marcaron radioactivamente y se hibridaron con los oligonucleótidos correspondientes como se describe en el apartado 2.4. Para generar la

molécula no marcada que actúa como molde se hibridaron los oligonucleótidos correspondientes indicados en cada caso en presencia de Tris HCl 50 mM, pH 7,5 y NaCl 0,3 M.

Las reacciones se llevaron a cabo en 10 μ l en presencia de Tris HCl 50 mM, pH 7,5, DTT 1 mM, glicerol 5%, BSA 0,1 mg/ml, 2,5 nM del sustrato marcado, 3x del sustrato no marcado, y las concentraciones de $MgCl_2$ ó $MnCl_2$, proteína y ddNTPs indicados en cada caso. Tras una incubación de 60 min a 30 °C, se detuvieron las reacciones añadiendo tampón de carga (formamida 95%, EDTA 10 mM, pH 8, xilencianol 0,1% y azul de bromofenol 0,1%). Los productos se resolvieron y analizaron mediante electroforesis en geles de 20% poliacrilamida-8 M urea y posterior autorradiografía.

2.8 Ensayos de reparación por escisión de base. Análisis de la actividad deoxirribosafosfato liasa (dRP-liasa)

El oligonucleótido P6-1 (180 pmol) (**Tabla 3**), con un uracilo en posición 16, se hibridó con un oligonucleótido complementario: T4 (**Tabla 3**) (relación 1:1) en presencia de 50 mM Tris HCl pH 7,5 y 0,3 M NaCl. El híbrido P6-1/T4 se marcó en el extremo 3' empleando Klenow (2 u) y [α - ^{32}P] dCTP (80 μ Ci). Este sustrato (500 nM) se incubó con hUDG (100 nM) a 37 °C durante 20 min en 20 μ l de tampón compuesto de 50 mM Hepes (pH 7.5), 20 mM KCl y 2 mM DTT para eliminar el uracilo. Tras la incubación, se añadió $MgCl_2$ a una concentración final de 10 mM y 50 nM hAPE, para generar el sustrato de la actividad dRP liasa.

Las reacciones (25 μ l) contuvieron 50 mM Hepes (pH 7,5), 20 mM KCl, 2 mM DTT y 100 nM del sustrato descrito anteriormente. Las reacciones se iniciaron con la adición de las cantidades indicadas de cada DNA polimerasa y se incubaron a 37 °C durante 20 min. Tras la incubación, se añadió $NaBH_4$ a una concentración final de 340 mM y las reacciones se mantuvieron en hielo durante 20 min. Los productos estabilizados (reducidos) se precipitaron O/N en presencia de etanol 100%, 0,5 M de $AcNH_4$ y 0,2 μ g/ml de tRNA. Se lavó el precipitado con etanol al 70% y se dejó secar. Por último se resuspendieron las muestras en tampón de carga (formamida 95%, EDTA 10 mM, pH 8, xilencianol 0,1% y azul de bromofenol 0,1%) y se analizaron por electroforesis en un gel de poliacrilamida al 20% en presencia de 8 M urea. Los productos se visualizaron autorradiografía.

2.9 Ensayos de síntesis a través de lesiones

2.9.1 Estudio de la capacidad de inserción frente a la base modificada 8oxoG y de la capacidad de inserción de 8oxodGTP libre

Para el estudio de la capacidad de inserción frente a la base modificada 8oxoG, el oligonucleótido Pber (**Tabla 3**) se marcó radioactivamente y se hibridó con los oligonucleótidos molde T4G y T4-8oxoG (**Tabla 3**), como se describe en el apartado 2.4, para formar una molécula tipo molde/iniciador y cuando se indique también con el oligonucleótido D8-P para formar una molécula tipo *gap* de un nucleótido con un grupo P en su extremo 5'. Para el estudio de la capacidad de inserción de 8oxodGTP libre, el oligonucleótido marcado Pber se hibridó de la misma manera con los oligonucleótidos molde T4A y T4C y con el oligonucleótido D8-P para formar una molécula tipo *gap* de un nucleótido con un grupo P en su extremo 5'.

Las reacciones de polimerización se llevaron a cabo en 20 μ l en presencia de Tris HCl 50 mM, pH 7,5, MgCl₂ 2,5 mM, DTT 1 mM, glicerol 5%, BSA 0,1 mg/ml, 2,5 nM del sustrato marcado, y concentraciones de proteína y nucleótido indicadas en cada caso. Tras una incubación de 20 min a 30 °C, se detuvieron las reacciones añadiendo tampón de carga (formamida 95%, EDTA 10 mM, pH 8, xilencianol 0,1% y azul de bromofenol 0,1%). Los productos se resolvieron y analizaron mediante electroforesis en geles de 20% poliacrilamida-8 M urea y posterior autorradiografía.

2.9.2 Estudio de la capacidad de extensión de los pares erróneos 8oxodG:dC y 8oxodG:dA

Para el estudio de la capacidad de extensión del par control dG:dC y los pares erróneos 8oxodG:dC y 8oxodG:dA se marcaron los oligonucleótidos PberC y PberA (**Tabla 3**) se marcaron radioactivamente y se hibridó PberC con los oligonucleótidos molde T4G y T4-8oxoG (**Tabla 3**) y PberA con el oligonucleótido molde T4-8oxoG (**Tabla 3**) y con el oligonucleótido downstream D2P-8 en ambos casos con como se describe en el apartado 2.4, para formar una molécula tipo *gap* de un nucleótido con un grupo P en su extremo 5'.

Las reacciones de polimerización se llevaron a cabo en 20 μ l en presencia de Tris HCl 50 mM, pH 7,5, MgCl₂ 2,5 mM, DTT 1 mM, glicerol 5%, BSA 0,1 mg/ml, 2,5 nM del sustrato marcado, y concentraciones de proteína y nucleótido indicadas en cada caso. Tras una incubación de 20 min a 30 °C, se detuvieron las reacciones añadiendo tampón de carga (formamida 95%, EDTA 10 mM, pH 8, xilencianol 0,1% y azul de bromofenol 0,1%). Los productos se resolvieron y analizaron mediante electroforesis en geles de 20% poliacrilamida-8 M urea y posterior autorradiografía.

2.9.3 Estudio de la capacidad de inserción frente a la base modificada 5-FU y de la capacidad de inserción de 5-FdUTP libre

Para el estudio de la capacidad de inserción frente a la base modifica 5-FU, el oligonucleótido pFU (**Tabla 3**) se marcó radioactivamente y se hibridó con los oligonucleótidos molde p6T, p6U y p6-5FU (**Tabla 3**) como se describe en el apartado 2.4, para formar una molécula tipo molde/iniciador y cuando se indique también con el oligonucleótido D5FU-P para formar una molécula tipo *gap* de un nucleótido con un grupo P en su extremo 5'. Para el estudio de la capacidad de inserción de 5FdUTP

libre, se marcó el oligonucleótido Pber (**Tabla 3**) de la misma manera, y se hibridó con los oligonucleótidos molde T4A y T4G para formar un molécula tipo molde/iniciador.

Las reacciones de polimerización se llevaron a cabo en 20 μ l en presencia de Tris HCl 50 mM, pH 7,5, MgCl₂ 2,5 mM, DTT 1 mM, glicerol 5%, BSA 0,1 mg/ml, 2,5 nM del sustrato marcado, y concentraciones de proteína y nucleótido indicadas en cada caso. Tras una incubación de 20 min a 30 °C, se detuvieron las reacciones añadiendo tampón de carga (formamida 95%, EDTA 10 mM, pH 8, xilencianol 0,1% y azul de bromofenol 0,1%). Los productos se resolvieron y analizaron mediante electroforesis en geles de 20% poliacrilamida-8 M urea y posterior autorradiografía.

2.10 Proteólisis parcial con proteinasa K

El ensayo de proteólisis parcial se llevó a cabo en Tris HCl 50 mM, pH 7,5, DTT 1 mM, glicerol 10%, 4 μ g de las proteínas indicadas y la cantidad de proteinasa K indicada en cada caso. Tras una incubación a 25 °C durante 1 min, las reacciones se detuvieron con tampón de ruptura (Tris HCl 25 mM, pH 6,8, glicerol 5%, SDS 0,5%, β -mercaptoetanol 0,5% y azul de bromofenol). Los productos se resolvieron mediante electroforesis en geles de SDS-PAGE al 12% y se tiñeron posteriormente con Azul de Coomassie.

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados en las diferentes estrategias de clonaje y mutagénesis dirigida en esta Tesis Doctoral.

Nombre	Secuencia (5' -> 3')
R57W-S	GGACGAGCCTGGGCAGAAC
R57W-AS	GTTCTGCCCAGGCTCGTCC
T221P-S	GGCCACTACCCCCCTCCCTTG
T221P-AS	CAAGGGAGGGGGGGTAGTGGCC
T221S-S	GGCCACTACCCCTCCTCCCTTG
T221S-AS	CAAGGGAGGAGGGGTAGTGGCC
S222F-S	CCCCACCTTCCTTGAGGGAG
S222F-AS	CTCCCTCAAGGAAGGTGGGG
T458R-S	GGGTTCCCTCAGAGATGACTTGG
T458R-AS	CCAAGTCATCTCTGAGGAACCC
S463T-S	GATGACTTGGTGACCCAAGAGG
S463T-AS	CCTCTTGGGTACCAAGTCATC
R487W-S	GGCGGCACTGGCGCTGGACATCATCG
R487W-AS	CGATGATGTCCAGGCGCCAGTGCCGCC
W239Y-S	CCTGCTGTCTGGATAAGTATGTCTGTGCACAGCCC
W239Y-AS	GGGCTGTGCACAGACATACTTATCCAGGACAGCAGG
W239G-S	CCTGCTGTCTGGATAAGGGGGTCTGTGCACAGCCC
W239G-AS	GGGCTGTGCACAGACCCCTTATCCAGGACAGCAGG
C241S-S	GTCCTGGATAAGTGGGTCAAGTGCACAGCCCTCAAGC
C241S-AS	GCTTGAGGGCTGTGCACTGACCCACTTATCCAGGAC
C241G-S	GTCTTGATAAGTGGGTGCGGTGCACAGCCCTCAAGC
C241G-AS	GCTTGAGGGCTGTGCACCGACCCACTTATCCAGGAC
Q243R-S	GTGGGTCTGTGCACGGCCCTCAAGCCAGAAGGCG
Q243R-AS	CGCCTTCTGGCTTGAGGGCCGTGCACAGACCCAC
Q243G-S	GTGGGTCTGTGCAGGGCCCTCAAGCCAGAAGGCG
Q243G-AS	CGCCTTCTGGCTTGAGGGCCCTGCACAGACCCAC
S245T-S	TGGGTCTGTGCACAGCCACAAGCCAGAAGGCGACC
S245T-AS	GGTCGCCTTCTGGCTTGTGGGCTGTGCACAGACCCA
S245G-S	TGGGTCTGTGCACAGCCCGGAAGCCAGAAGGCGACC
S245G-AS	GGTCGCCTTCTGGCTTCCGGGCTGTGCACAGACCCA
Nail-S	GGCCAAAACCAAGGGCATGAGTCTGTGACAACATGGGCTGTTTGACCCGGAGCAGA
Nail-AS	AGACATTTTTTCCAAGCGGCTTCAGAGAAGGATGTCTTCAGGCTCTTAGGCCTCCCC
Loop1-S	GGGGAGGCCTAAGAGCCTGAAGACATCCTTCTCTGAAGCCGCTTGGA AAAATGTCCTC
Loop1-AS	TGCTCCGGGTCAAACAGCCCATGTTCTGACAGACTCATGCCCTTGGTTTTGGCC
BRCT+YACQR-S	GCCGCCTCCTTGACAGTCTTCGGCAGGAAGGGCTCATCCTGTACCACCAGCACCAGC
BRCT+YACQR-AS	ACAGCTGCTGTGAGTCCCCTACCCGCCTGGCCCAACAGAGCCACATGGACGCTTT
BRCT-S	TGAGAGAAGTTTCTGCATTTTCCGGCTCCCAGGGCCAGGGCGGGCAGCCGG
BRCT-AS	CCGGTGCCGCCGCCCTGGCCCTGGGAGCCGGA AAAATGCAGAACTTCTCTCA
BRCT+YACQR-S	AAAGCGTCCATGTGGCTCTGTTGGGCCAGGCGGGTAGGGGACTCACAGCAGCTGT
BRCT+YACQR-AS	GCTGGTGCTGGTGGTACAGGATGAGCCCTTCTTGCCGAAGACTGTCAAGGAGGCGGC
BRCT-S	CCCCCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATG
BRCT-AS	CTCCCCAAACGGCGGCG
BRCT+YACQR-S	GGTCGCCTTCTGGCTTGAGGGGCGCTGGCAGGCATAGGCAGGC
BRCT+YACQR-AS	GGGCCTCTGAGCCAGCATGGATGCCTGCCTGGGTCTGTGCACAGCCCTCA
BRCT-S	AGCCAGAAGGCGACCAATCACAACC
BRCT-AS	GGCTTGAGGGCTGTGCACAGACCCAGGCAGGCATCCATGCTGGGCTCAGAGGCC

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados como sustratos de DNA en los ensayos bioquímicos en esta Tesis Doctoral.

Nombre	Secuencia (5' -> 3')
Sp1C	GATCACAGTGAGTAC
Sp1G	GATCACAGTGAGTAG
Sp1A	GATCACAGTGAGTAA
Sp1T	GATCACAGTGAGTAT
T13A	AGAAGTGTATCTAGTACTCACTGTGATC
T13C	AGAAGTGTATCTCGTACTCACTGTGATC
T13G	AGAAGTGTATCTGGTACTCACTGTGATC
T13T	AGAAGTGTATCTTGTACTCACTGTGATC
T18	ACTGGCCGTCGTTCTATTGTACTCACTGTGATC
Dg1	AGATACACTTCT
Dg5P	AACGACGGCCAGT
P6-1	CTGCAGCTGATGCGCUGTACGGATCCCCGGGTAC
T4	GTACCC GGGGATCCGTACGGCGCATCAGCTGCAG
Pber	CTGCAGCTGATGCGC
PberA	CTGCAGCTGATGCGCA
PberC	CTGCAGCTGATGCGCC
T4A	GTACCCGGGGATCCGTACAGCGCATCAGCTGCAG
T4C	GTACCCGGGGATCCGTACCGCGCATCAGCTGCAG
T4G	GTACCCGGGGATCCGTACGGCGCATCAGCTGCAG
T4-8oxoG	GTACCCGGGGATCCGTAC8GCGCATCAGCTGCAG
D8-P	GTACGGATCCCCGGGTAC
D2P-8	TACGGATCCCCGGGTAC
pFU	GTACCCGGGGATCCGTAC
P6T	GTACCCGGGGATCCGTACTGCGCATCAGCTGCAG
P6U	GTACCCGGGGATCCGTACUGCGCATCAGCTGCAG
P6-5FU	GTACCCGGGGATCCGTAC5FUGCGCATCAGCTGCAG
D5FU-P	GCGCATCAGCTGCAG
PolydA	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
FP-P	GGCCACGCAATGTTGACGTTTTTCGACAAGACCTCAGTAT
FP-T	GGCAGCTTGGATCTTGTGCGAAAAACGTCAACATTGCGCTAGGCTTCGG CAATACTGAGGTCTTGTGCGAAAAACGTCAACATTGCGTGGCC
FP-D	GCCGAAGCCTAGGCGAATGTTGACGTTTTTCGACAAGATCCAAGCTGCC
NHEJ-C	CCCTCCCTCCCC
NHEJ-GC	CCCTCCCTCCCCG
NHEJ-GCC	CCCTCCCTCCCCGC
NHEJ-GCCC	CCCTCCCTCCCCGCC
NHEJ-2C	GCACTCACGTCCCCC
NHEJ-CG	GCACTCACGTCCCCG
NHEJ-CGG	GCACTCACGTCCCCGG
NHEJ-CGGG	GCACTCACGTCCCCGGG
NHEJ-GTT	CCCTCCCTCCCCGT
NHEJ-CAA	GCACTCACGTCCCCAA
NHEJ-D1	GGGAGGGAGGG
NHEJ-D1Nick	CGGGAGGGAGGG
NHEJ-D2	GGGACGTGAGTGC
NHEJ-T	GCACTCACGTCCCCGGCGGGAGGGAGGG
D1	CGGAGGGAGGG
D1-1	GGGAGGGAGGG
D2	GGGACGTGAGTGCGCG
D2-1	GGACGTGAGTGCGCG
D2-T	TGGACGTGAGTGCGCG
D3	CCCTCCCTCCGCGGC
D3-Flap	CCCTCCCTCCGCGGA
D3-BB1	CCCTCCCTCCGCGGAC
D3-BB2	CCCTCCCTCCGCGAGC
D3+C	CCCTCCCTCCGCGGCC
D3+C-MM	CCCTCCCTCCGCGGAC

Nombre	Secuencia (5' -> 3')
D3+C MM2	CCCTCCCTCCGCGACC
D3+A	CCCTCCCTCCGCGGCA
D3+C BB1	CCCTCCCTCCGCGGCAC
D3+C BB2	CCCTCCCTCCGCGGACC
D3+C BB3	CCCTCCCTCCGCGAGCC
D3-1	CCCTCCCTCCGCGC
D3-2	CCCTCCCTCCGCC
D3-3	CCCTCCCTCCGC
D4-C	CGCGCACTCACGTCCCCGCC
D4-GA	CGCGCACTCACGTCCCAGGCC
D4-GC	CGCGCACTCACGTCCCCGGCC
D4-GG	CGCGCACTCACGTCCCCGGGCC
D4-GT	CGCGCACTCACGTCCCCTGGCC
D4-TC	CGCGCACTCACGTCCCCTGCC
D4-AC	CGCGCACTCACGTCCCCAGCC
D4-CC	CGCGCACTCACGTCCCCCGCC
D4-1	CGCGCACTCACGTCCCCGGC
D4-8oxoG	CGCGCACTCACGTCCCC8GGCC
D4-8oxoGC	CGCGCACTCACGTCCCC8GCC
D4-GC-FLAP	CGCGCACTCACGTCCCCGGCA
D4-GC BB1	CGCGCACTCACGTCCCCGAGCC
D4-GC BB2	CGCGCACTCACGTCCCCGGACC
D4-2pb	CGCGCACTCACGTCCCCGC
D4-1pb	CGCGCACTCACGTCCCCG
D4-0pb	CGCGCACTCACGTCCCC
T-NHEJ-4pb	CGCGCACTCACGTCCCCGGCCGCGGAGGGAGGG
P-Nail	GATCAGCTGCAGTAC
D-Nail	GCCGACACTTCT
T-Nail	AGAAGTGTCGGCAGTACTGCAGCTGATC
T-2C	AGAAGTGTCGGCAGTACTGCAGCTGATC
T-2A	AGAAGTGTCGGCAGATACTGCAGCTGATC
T-2G	AGAAGTGTCGGCAGGTACTGCAGCTGATC
T-2T	AGAAGTGTCGGCAGTTACTGCAGCTGATC
T-3C	AGAAGTGTCGGCAGTCACTGCAGCTGATC
T-4C	AGAAGTGTCGGCAGTACCTGCAGCTGATC
T-6C	AGAAGTGTCGGCAGTACTCGCAGCTGATC
T-7C	AGAAGTGTCGGCAGTACTGCCAGCTGATC
T-2CC	AGAAGTGTCGGCAGCCTACTGCAGCTGATC

RESULTADOS

1

*Polλ y la reparación de roturas de doble
cadena mediante NHEJ*

1.1 Polλ en la reparación de roturas de doble cadena

En eucariotas superiores el principal mecanismo de reparación de roturas de doble cadena (DSBs) es mediante la reunión de extremos no homólogos (NHEJ). En mamíferos son 3 las DNA polimerasas de la Familia X implicadas en este proceso (Polλ, Polμ y TdT). Aunque la interacción de Polβ con algunos de los factores de NHEJ ha sido demostrada (Mahajan et al., 2002b), no interviene en este mecanismo de reparación. A pesar de ser 3 las polimerasas capaces de llevar a cabo la reparación por NHEJ, sus funciones parecen no ser redundantes, al poseer un amplio espectro de dependencia de molde lo que hace que cada una de ellas tenga un papel en esta vía de reparación (Nick McElhinny & Ramsden, 2004; Nick McElhinny et al., 2005). La ruta de reparación por NHEJ se sirve de polimerasas especializadas capaces de unir dos extremos de DNA a la vez: un extremo 3'OH protuberante que actúa como iniciador y otro extremo también 3' protuberante, que actúa como molde y posee un grupo fosfato 5' recesivo. Tanto Polλ como Polμ son capaces de unir y reparar estas dobles roturas, reparando primero uno de los *gaps* que se forman y posteriormente el segundo. Sin embargo, solo Polμ es capaz de lidiar con extremos no complementarios.

Para poder profundizar en las diferencias intrínsecas de Polλ y Polμ que hacen que tengan diferentes habilidades y funciones en NHEJ, el primer objetivo de esta Tesis fue la puesta a punto de un ensayo de NHEJ *in vitro* en ausencia de factores auxiliares. Esto nos permitiría posteriormente ahondar en la capacidad de Polλ de resolver situaciones más complejas (bases dañadas, desapareamientos en las roturas...). La disponibilidad de sus estructuras cristalográficas nos permite además, comprender mejor la base molecular de su comportamiento ante las diferentes situaciones.

Para analizar la capacidad de Polλ de reunir dos extremos de DNA 3' protuberantes en ausencia de los factores auxiliares de NHEJ llevamos a cabo un ensayo en el que suministramos dos sustratos de DNA de doble cadena (**Figura 11**): el primero de ellos marcado radiactivamente en su extremo 5', siendo 3' protuberante con 3 bases de protuberancia (azul); el segundo (naranja), también 3' protuberante con 2 bases complementarias al anterior, será el que actúe de molde en *trans*. Aunque dirigida por la base molde, ya que solo se produjo la inserción de ddGTP frente a dC, la eficiencia de la reacción de NHEJ en ausencia de los factores auxiliares fue muy baja (**Figura 11A**). Con la finalidad de aumentarla, se realizó este mismo ensayo variando algunos de los parámetros, como el contexto de secuencia. La reacción de reparación de Polλ fue dependiente de secuencia, y por extensión de la estabilidad de la conexión, ya que se obtuvo un nivel similar de reacción con una concentración 10 veces inferior de ddNTPs cuando la conexión estaba formada por pares de bases dC:dG en lugar de pares de bases dT:dA (**Figura 11B**).

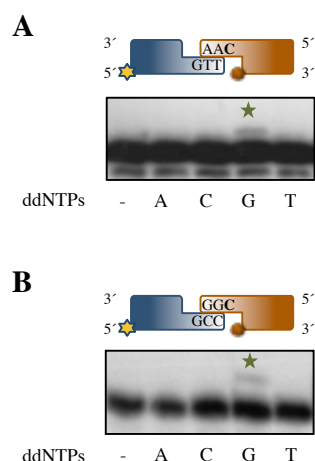


Figura 11. Importancia del contexto de secuencia en la conexión durante la reacción de NHEJ. La reacción se llevó a cabo como se describe en Materiales y Métodos. El sustrato marcado (azul) está formado por hibridación de los oligonucleótidos NHEJ-GTT y NHEJ-GCC con NHEJ-D1 y el sustrato no marcado (naranja) por hibridación de NHEJ-CAA y NHEJ-CGG respectivamente con NHEJ-D2. La esfera naranja indica la presencia del grupo 5'P en la cadena *downstream* del sustrato. Se muestra con un asterisco verde la incorporación correcta de ddGTP frente a dC. Las reacciones se incubaron durante 60 min a 37 °C, en presencia de 1 mM Mn²⁺, 1 μM DNA polimerasa y 100 μM ddNTPs (A) o 10 μM ddNTPs (B).

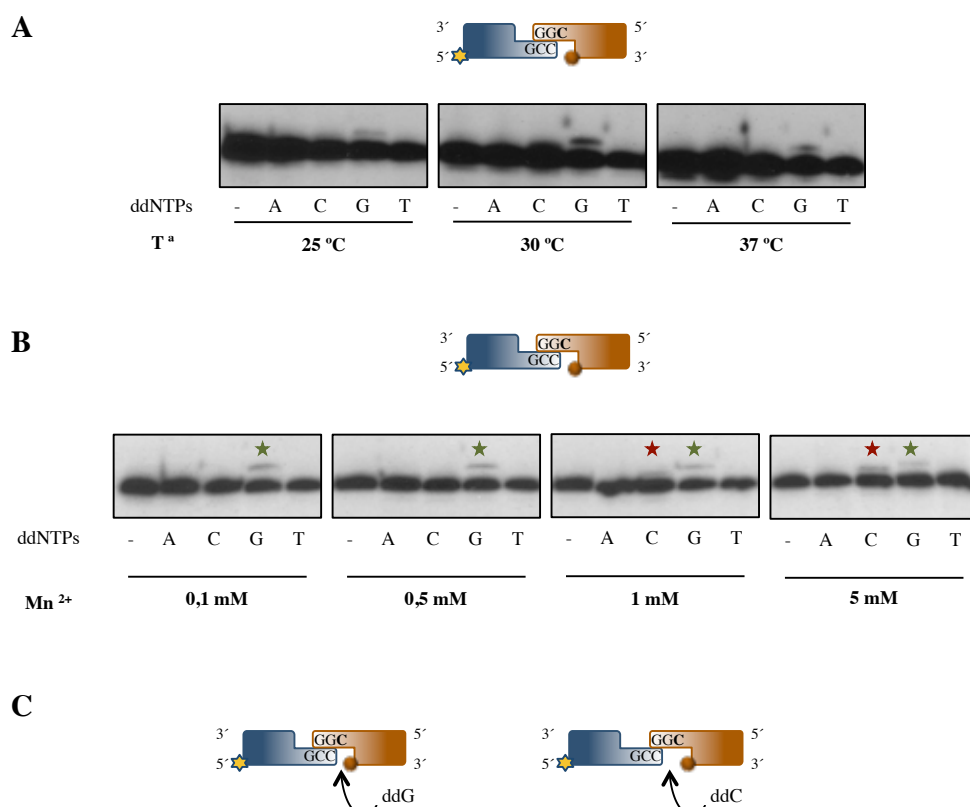


Figura 12. Optimización de la reacción de NHEJ. **A.** Influencia de la temperatura en la eficiencia de la reacción. La reacción se llevó a cabo como se describe en Materiales y Métodos, en presencia de 1 mM Mn²⁺, 10 μM ddNTPs, 500 nM DNA polimerasa durante 1 h a las temperaturas indicadas. **B.** Importancia de la dosis de Mn²⁺ en la fidelidad de la reacción. La reacción se llevó a cabo como se describe en Materiales y Métodos, en presencia 10 μM ddNTPs, 500 nM DNA polimerasa durante 1 h a 30 °C y a las concentraciones de Mn²⁺ indicadas. Se muestran con un asterisco verde la incorporación correcta de ddGTP frente a dC y con un asterisco rojo la incorporación incorrecta de ddCTP frente a dC. En ambos casos el sustrato marcado (azul) está formado por hibridación de los oligonucleótidos NHEJ-GCC con NHEJ-D1 y el sustrato no marcado (naranja) por hibridación de NHEJ-CAA y NHEJ-CGG respectivamente con NHEJ-D2. La esfera naranja indica la presencia del grupo 5'P en la cadena *downstream* del sustrato. **C.** Representación esquemática del apareamiento entre los dos extremos de DNA. La unión de los extremos mediante 2 pb permite la incorporación de ddGTP (izquierda); la unión mediante 1 pb favorece la incorporación de ddCTP (derecha).

Otras variaciones estudiadas fueron: incubar el complejo E:DNA antes de la adición del dNTPs, lo que no mejoró la reacción; favorecer la reacción con polietilenglicol (PEG), aumentar el tiempo de reacción y bajar la temperatura a 30 °C, lo que sí mejoró la eficiencia de la reacción (**Figura 12A**). Por último, quisimos determinar la concentración de Mn^{2+} óptima. El rango de dosis de este metal activador que permitió la inserción de ddGTP frente a dC fue amplio, desde 0,1 mM a 5 mM. Sin embargo, la eficiencia de la reacción varía así como su fidelidad. A dosis altas de Mn^{2+} se observó también la inserción de ddCTP (**Figura 12B**). La incorporación de ddCTP puede ser debida a que la conexión entre ambos extremos de DNA no sea de 2 pb sino de 1 único par de bases dG/dC, quedando dG como la base que dirige la inserción de ddCTP (**Figura 12C derecha**).

1.2 Importancia de la complementariedad en la sinapsis

Como hemos mencionado anteriormente, una de las principales diferencias entre Polμ y Polλ es la incapacidad de la última para reparar DSBs cuyos extremos no son complementarios. Para determinar la eficiencia de la reacción de Polλ en conexiones con diferente número de bases apareadas llevamos cabo un ensayo en el que los extremos de DNA forman uniones con extremos incompatibles, es decir, no hay apareamiento (0 pb), y extremos que permiten la formación de conexiones con apareamientos desde 1 a 3 pares de bases (1 pb, 2 pb y 3 pb respectivamente). En estos experimentos se utilizó una concentración de Mn^{2+} de 0.1 mM, para minimizar incorporaciones erróneas, o la estabilización de conexiones alternativas. Como se muestra en la **Figura 13A**, no se detectó actividad si no hay apareamiento, pero sí cuando el apareamiento fue de únicamente 1 pb, mejorando a medida que se incrementó el número de bases de conexión (**Figura 13B y C**). En las conexiones de 1 y 2 pb, la reacción fue fiel, con la única inserción de ddGTP dirigida por la base molde dC, pero en la conexión de 3pb se insertaron errores (ddC y ddT) (**Figura 13A**).

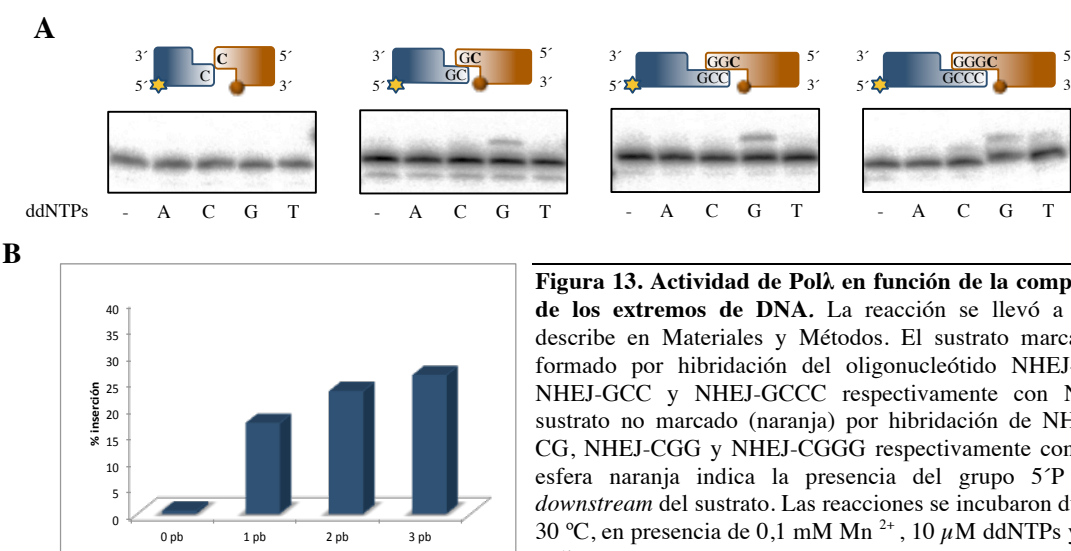


Figura 13. Actividad de Polλ en función de la complementariedad de los extremos de DNA. La reacción se llevó a cabo como se describe en Materiales y Métodos. El sustrato marcado (azul) está formado por hibridación del oligonucleótido NHEJ-C, NHEJ-GC, NHEJ-GCC y NHEJ-GCCC respectivamente con NHEJ-D1 y el sustrato no marcado (naranja) por hibridación de NHEJ-2C, NHEJ-CG, NHEJ-CGG y NHEJ-CGGG respectivamente con NHEJ-D2. La esfera naranja indica la presencia del grupo 5'P en la cadena downstream del sustrato. Las reacciones se incubaron durante 60 min a 30 °C, en presencia de 0,1 mM Mn^{2+} , 10 μ M ddNTPs y 500 nM DNA polimerasa.

Con el objetivo de confirmar que la reacción que estamos observando es una reacción de reparación por reunión de extremos no homólogos mediada Pol λ , es decir que es la propia Pol λ la que es capaz de unir dos extremos de DNA 3' protuberantes y rellenar el *gap* que forman, comparamos la eficiencia de esta reacción con la del relleno de un *gap* equivalente, que llevamos como ensayo control. Así, comparamos la actividad de reparación de una única rotura (*gap* de un nucleótido con extremos 5'P; GAP1P) con la actividad de reparación de dobles roturas por NHEJ. Además evaluamos la actividad en ambos sustratos con 3 proteínas diferentes. En primer lugar Pol λ . En segundo lugar la región del *core* de Pol λ (Pol λ -core), es decir, carente del dominio BRCT y de la región Ser/Pro. Pol λ -core es una variante truncada activa, que presenta una propiedades bioquímicas similares a Pol λ en el relleno de *gaps* (Garcia-Diaz et al., 2004), pero que no ha sido evaluada en NHEJ. En tercer lugar Pol β , capaz de rellenar pequeños *gaps* en el DNA pero no de completar reacciones de reparación por NHEJ. Como se esperaba, las 3 proteínas fueron capaces de rellenar el GAP1P eficazmente y de manera fiel (**Figura 14A**). Sin embargo, solo Pol λ y Pol λ -core fueron capaces de unir dos extremos de DNA 3' protuberantes con dos bases complementarias y rellenar el *gap* que forman, usando como molde la dC suministrada en *trans* (molécula naranja) (**Figura 14B**). A pesar de compartir un 32% de similitud de secuencia, Pol β no fue capaz de completar la reacción. Estos resultados ponen de manifiesto que la función de Pol λ en NHEJ no solo viene determinada por su dominio BRCT, que le permite ser reclutada eficientemente a los extremos del DNA por interacción con otros factores de NHEJ, sino que su *core* posee la capacidad intrínseca de mediar la interacción de extremos complementarios, y llevar a cabo las inserciones necesarias para la reparación.

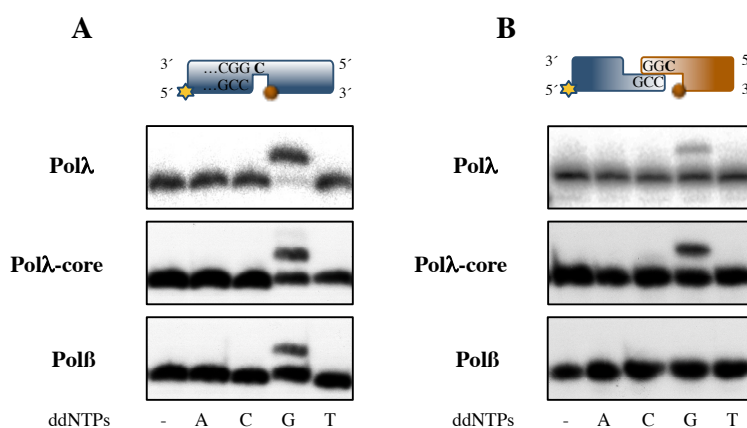


Figura 14. Actividad de reparación en un GAP1P versus contexto de NHEJ de Pol λ , Pol λ -core y Pol β . A. Se marcó el oligonucleótido NHEJ-GCC y se hibridó con NHEJ-T y NHEJ-D2. La reacción se llevó a cabo en presencia de 2,5 mM Mg $^{2+}$, 100 nM ddNTPs y 50 nM de cada DNA polimerasa durante 20 min y a 30 °C en el caso de Pol λ y a 37 °C para Pol λ -core y Pol β . B. El sustrato marcado (azul) está formado por hibridación del oligonucleótido NHEJ-GCC con NHEJ-D1 y el sustrato no marcado (naranja) por hibridación de NHEJ-CGG con NHEJ-D2. La reacción se llevó a cabo en presencia de 0,1 mM Mn $^{2+}$, 10 μ M ddNTPs y 500 nM DNA polimerasa durante 60 min y a 30 °C en el caso de Pol λ y a 37 °C para Pol λ -core y Pol β . La esfera naranja indica la presencia del grupo 5'P en la cadena *downstream* del sustrato.

Con el fin de estudiar en mas detalle las reacciones de NHEJ mediadas por Polλ, nos planteamos utilizar una serie de oligonucleótidos donde el extremos iniciador y el extremo molde son de diferente tamaño. Por tanto, ambos pueden ser marcados radioactivamente, permitiéndonos seguir lo que ocurre en ambos *gaps* de la rotura. Al igual que en los anteriores sustratos utilizados, las bases que aparean para formar la sinapsis son dG:dC. Lo primero que nos preguntamos fue si podíamos aumentar la eficiencia de la reacción, aumentando en un par de bases la conexión, es decir, crear una unión de 4 pares de bases (4 pb).

Sorprendentemente, el aumento en 1 pb del número total de pares de bases que forman la conexión (de 3 a 4 pares de bases), tuvo como consecuencia un gran incremento en la eficiencia de la reacción, llegando incluso a observarse una eficiencia de extensión del extremo iniciador del 100% a concentraciones menores de ddGTP (**Figura 15A**). Con esta serie de oligonucleótidos, la eficiencia de la reacción también fue mayor con una conexión de 3 pb, probablemente debido al aumento de longitud de los sustratos. Esto nos permitió observar que la reacción también ocurre en presencia de iones Mg^{2+} , aunque menos eficientemente. Al ser ya 4 los pares de bases que forman la conexión nos volvimos a preguntar si Polλ lo reconocía como un sustrato de NHEJ, contribuyendo a la unión de los dos extremos del DNA, o si al estar ya muy separados ambos *gaps*, la conexión (quizás intrínsecamente estable), sería reconocida como una rotura de banda simple con un solo *gap*. Llevamos a cabo dos controles: por un lado utilizando un sustrato de DNA con un único *gap* y por otro lado, utilizando un solo extremo (marcado en 5'P), el que proporciona el iniciador en la reacción de NHEJ. De nuevo observamos que la eficiencia de la reacción de Polλ en un GAP1P es superior a la observada en la reparación por NHEJ ya que requiere menor concentración de ddGTP, de proteína y menos tiempo de reacción (**Figura 15B**). Además, solo con uno de los extremos de DNA tampoco observamos reacción por lo que podemos decir que Polλ sí está uniando los dos extremos de DNA, consiguiendo su mayor eficiencia de reparación con una conexión de 4 pb (**Figura 15C**). En este mismo contexto quisimos comprobar si Polλ conseguía reparar de manera fiel y eficaz los dos *gaps* de la rotura. Marcando ambas cadenas, tanto la que actúa como iniciador (azul), como la que actúa como molde en *trans* (naranja), podemos seguir la reacción en ambos *gaps*. La **figura 15D** muestra cómo Polλ repara correctamente una rotura de doble cadena, insertando el nucleótido correcto tanto en el primer *gap* de la rotura (señalado con un 1) como en el segundo (señalado con un 2). La eficiencia y fidelidad de la reparación de ambos *gaps* es muy similar.

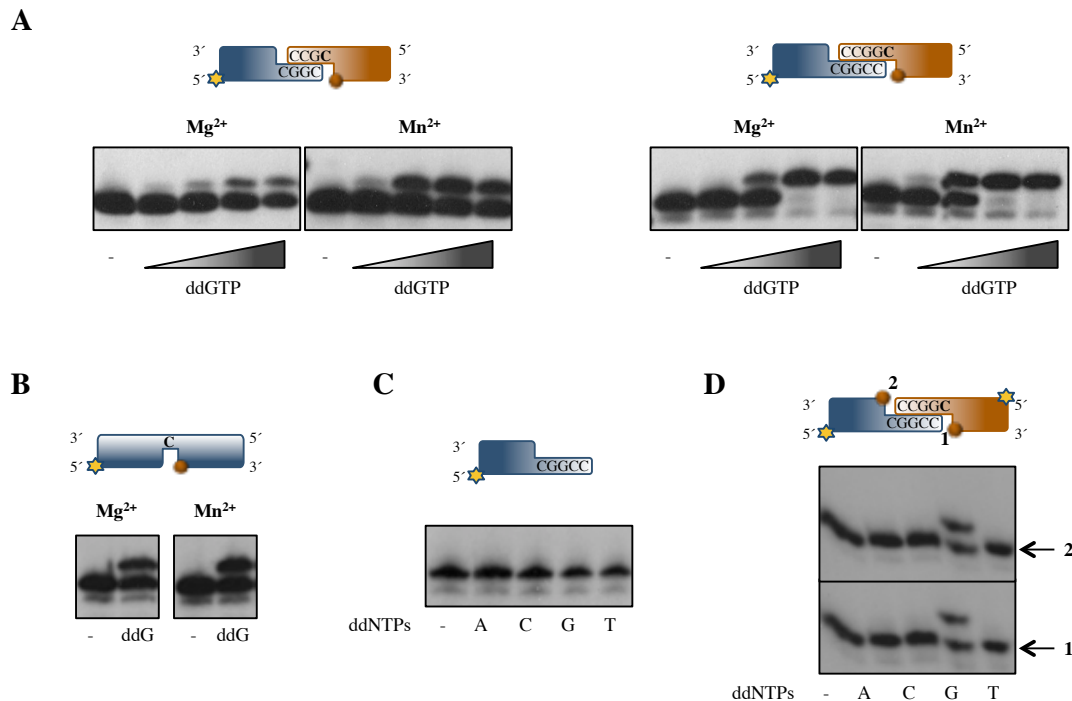


Figura 15. Conexión de 3 pb versus 4 pb. Las reacciones se llevaron a cabo como se describe en Materiales y Métodos. **A.** El sustrato marcado (azul) está formado por hibridación del oligonucleótido D3 y D3+C respectivamente con D1 y el sustrato no marcado (naranja) por hibridación de D4-C y D4-GC respectivamente con D2. La esfera naranja indica la presencia del grupo 5'P en la cadena *downstream* del sustrato. Las reacciones se incubaron durante 60 min a 30 °C, en presencia de 2,5 mM Mg²⁺ o 0,1 mM Mn²⁺, 500 nM DNA polimerasa y 10 nM, 100 nM, 1 μM y 10 μM ddGTP cuando la conexión es de 3 pb (izquierda) y 1 nM, 10 nM, 100 nM y 1 μM ddGTP cuando la conexión es de 4 pb. **B.** El sustrato se formó por hibridación de D3+C marcado con D2 y T-NHEJ-4pb. La reacción se incubó a 30 °C, 20 min en presencia de 2,5 mM Mg²⁺ o 1 mM Mn²⁺, 50 nM DNA polimerasa y 1 nM ddGTP. **C.** El sustrato está formado por hibridación del oligonucleótido D3+C con D1. La reacción se llevó a cabo durante 60 min a 30 °C en presencia de 0,1 mM Mn²⁺, 500 nM DNA polimerasa y 1 μM ddNTPs. **D.** El primer sustrato marcado (azul) está formado por hibridación del oligonucleótido D3+C con D1 y el segundo sustrato marcado (naranja) por hibridación de D4-GC con D2. Ambos sustratos presenta el grupo 5'P en sus cadenas *downstream*. La reacción se llevó a cabo como en C en presencia de 10 μM ddNTPs. El número 1 indica que la reacción ocurre sobre la sustrato azul; el número 2 indica que la reacción ocurre sobre el sustrato naranja.

Al ser tan llamativo el incremento de reacción con 4 pares de bases, nos preguntamos a qué podía ser debido. Gracias a las estructuras cristalográfica de Polλ disponibles, pudimos profundizar en las diferencias inherentes a una reacción de 3 y de 4 pb. Polλ posee entre las cadenas β3 y β4 del dominio *palma*, un *loop* que cambia de conformación del complejo binario al ternario (Figura 16A). Aunque es mucho más pequeño, es el *loop* equivalente al Loop 1 presente en Polμ y TdT (Delarue et al., 2002; Juárez et al., 2006). Este mini-Loop 1 está relacionado con la fidelidad de Polλ (Bebenek et al., 2010). En el complejo ternario (PDB id 1XSN), el Loop 1 de Polλ está interaccionando con la zona del molde *upstream* del sitio catalítico. Establece 5 interacciones mediante los residuos Ser⁴⁶³, Gln⁴⁷¹ y Lys⁴⁷² con las bases T₂, T₃ y T₄ (Siendo T₀ la base del molde que aparea con el extremos del iniciador; figura 16B y E). Cuando en la estructura del complejo ternario simulamos los sustratos de NHEJ, con conexiones de 3 y 4 pb observamos que las interacciones que pueden establecerse entre el Loop 1 y la zona de la conexión varían. En una sinapsis de 3 pb, se establecen 3 interacciones, con las

bases T₂, y T₄ (**Figura 16C y E**), quedando las dos partes de ese *gap* sujetas. Sin embargo, cuando la sinapsis es de 4 pb, las interacciones pasan a ser 4, encontrándose en las bases T₂, T₃ (**Figura 16D y E**). En este caso, el *gap* no queda unido por sus dos extremos pero la zona de la sinapsis queda más sujeta, por lo que la eficiencia de reacción con 4 pb de conexión aumenta. La importancia del Loop 1 de Polλ en la reacción de NHEJ será estudiado más en profundidad posteriormente.

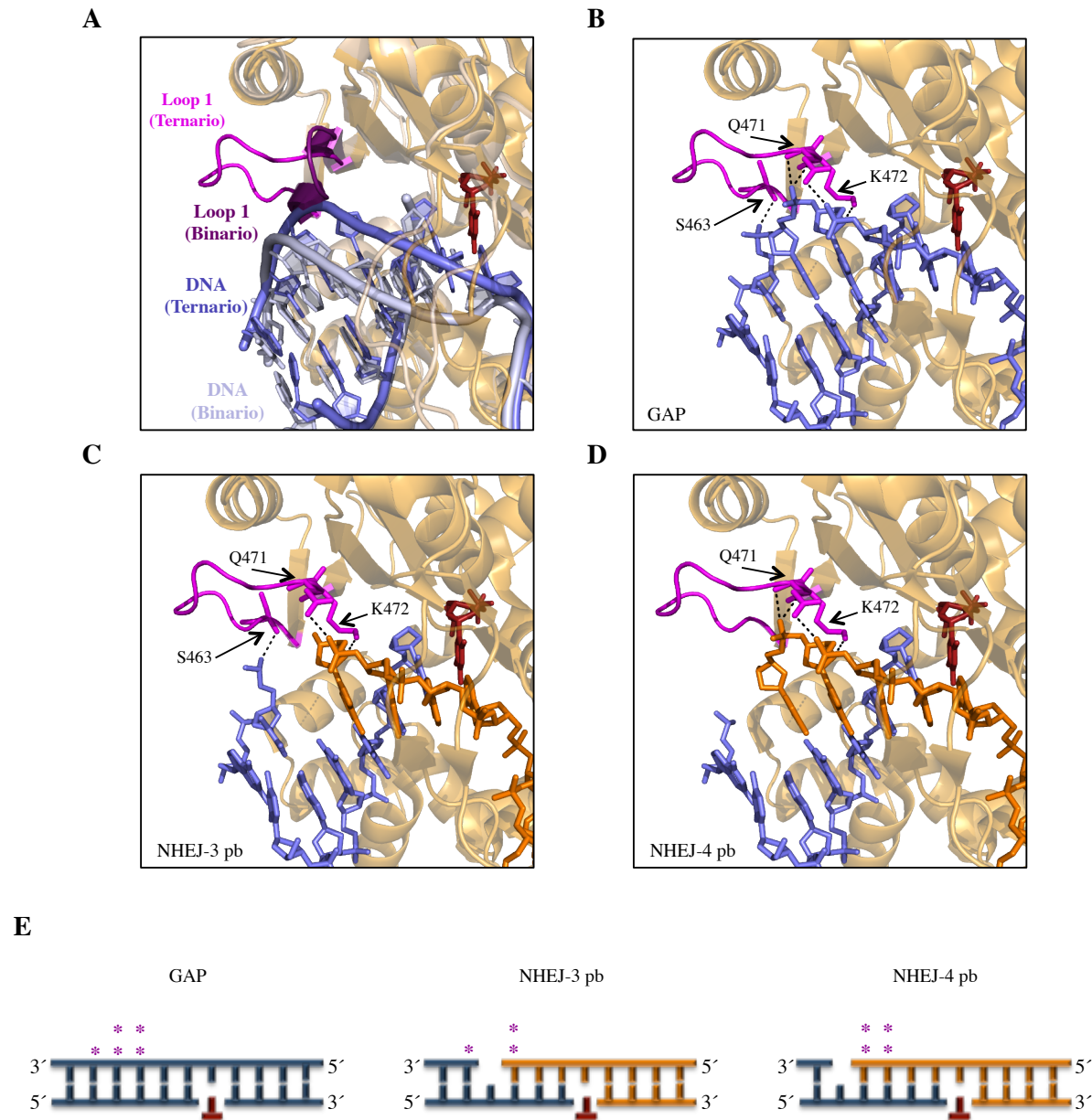


Figura 16. Importancia del Loop 1 de Polλ de durante la reacción de NHEJ. **A.** Superposición en *cartoon* del complejo binario (PDB id 1XSL) y del complejo ternario (PDB id 1XSN) de Polλ. El nucleótido entrante se muestra en rojo. Se observa el cambio de conformación del Loop 1 y del DNA. **B.** Interacciones que establecen los residuos del Loop 1 con la zona del molde en un GAP1P (PDB id 1XSN). **C.** Simulación de la reacción de NHEJ con 3 pb partiendo de la estructura en B. Se detallan las interacciones del Loop 1 con ambos extremos del DNA. **D.** Simulación de la reacción de NHEJ con 4 pb partiendo de la estructura en B. Se detallan las interacciones del Loop 1 con la zona de la conexión. En C y D se muestran los colores del DNA siguiendo el mismo código que hasta ahora: el sustrato marcado en azul y el sustrato no marcado en naranja. **E.** Esquema de las interacciones que se producen con la cadena molde en un *gap* (izquierda) o con las distintas conexiones de NHEJ estudiadas: 3 pb (centro) y 4 pb (derecha). Los asteriscos morados indican el número de interacciones de los residuos de la polimerasa con las bases del DNA. El nucleótido entrante se representa en rojo.

1.3 Importancia del grupo 5'P

Una característica común de las DNA polimerasas Pol β y Pol λ , es la estimulación de su actividad gracias a la presencia de un grupo fosfato en el extremo 5' de un *gap* de pequeño tamaño (Prasad et al., 1998; García-Díaz et al., 2002;). Recientemente se ha demostrado la importancia de este grupo 5'P para la unión de Pol μ al DNA y para su papel en las reparaciones de DSBs mediante NHEJ (Martin et al., 2012a). Para conocer su relevancia en las reacciones de NHEJ llevadas a cabo por Pol λ , evaluamos su actividad en presencia o ausencia del grupo 5'P. Así, observamos cómo su presencia es esencial para una reacción eficiente. Solo cuando la molécula de DNA que actúa como molde en *trans* (naranja) posee un grupo 5'P, Pol λ fue capaz de completar la reacción (**Figura 17** panel de la derecha). Cuando el grupo 5'P está presente en ambas moléculas de DNA observamos que la reacción es menos eficiente (**Figura 17** panel de la izquierda). Esto puede ser debido a que Pol λ esté llevando a cabo la inserción de ddGTP usando como molde no solo la molécula de DNA fría (naranja) sino también la marcada (azul). El grupo fosfato permitiría al enzima orientarse sobre la rotura de forma que la inserción ocurriera también sobre el segundo *gap*. En este caso no veríamos la inserción por no estar ambas moléculas marcadas. Para favorecer que la inserción tenga lugar únicamente sobre una de las moléculas de DNA y así poder estudiar en detalle lo que ocurre durante el relleno del primer *gap* de la doble rotura, limitaremos la presencia del grupo 5'P a la molécula de DNA no marcada (naranja).

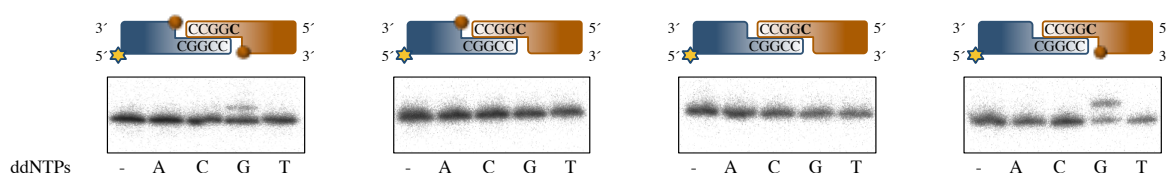


Figura 17. Importancia del grupo fosfato en el extremos 5' del *gap* durante la reacción de NHEJ. La reacción se llevó a cabo como se describe en Materiales y Métodos. El sustrato marcado (azul) está formado por hibridación de los oligonucleótidos D3+C y D1 y el sustrato no marcado (naranja) por hibridación de D4-GC con D2. La esfera naranja indica la presencia del grupo 5'P en la cadena *downstream* del sustrato. Las reacciones se incubaron durante 60 min a 30 °C, en presencia de 0,1 mM Mn²⁺, 10 nM ddNTPs y 500 nM DNA polimerasa.

1.4 Fidelidad en la reparación de DSBs

Las DNA polimerasas implicadas en los diferentes mecanismos de reparación y tolerancia al daño, se caracterizan porque su fidelidad es muy inferior a la de las polimerasas replicativas. La célula debe encontrar un equilibrio entre la necesidad de reparar el daño en el DNA y la fidelidad del proceso. Cuanto mayor sea la fidelidad durante la reparación de las DSBs menor será el riesgo de deleciones o inserciones en el DNA y la incorporación de bases erróneas que produzcan desapareamientos o errores en la pauta de lectura. Para analizar la fidelidad de la reacción de Pol λ en NHEJ cambiamos la base que actúa como molde (**Figura 18**). Pol λ reparó el primer *gap* formado tras



1.5.2 Importancia de la sinapsis: distancia entre los dos *gaps*

Para poder estudiar el efecto de la distancia entre los *gaps* de la rotura y si Pol λ es capaz de reparar roturas cuyos extremos de DNA dejan *gaps* mayores de un único nucleótido, partimos de la conexión óptima: 4 pb. Analizamos tres variaciones de esta sinapsis (**Figura 20**). En la primera de ellas, el segundo *gap* es de dos nucleótidos, quedando el extremo 5' del mismo, más alejado del primer *gap* cuya reparación analizamos. En la segunda variación, el segundo *gap* también es de dos nucleótidos pero esta vez como consecuencia de haber disminuido en una base la protuberancia del extremos de DNA cuya cadena que actúa como molde. Así, en este caso la conexión es de 3 pb pero el extremo 5' del segundo *gap* se sitúa a la misma distancia del primero que en la conexión de 4 pb control. En la tercera variación, el primer *gap* es de dos nucleótidos, como consecuencia de haber disminuido en una base la cadena *downstream* donde se encuentra el grupo 5'P. La conexión en este caso vuelve a ser de 4 pb pero los extremos de ambos *gaps* quedan más alejados. Con estas diferencias en los extremos de DNA utilizados, no solo variamos la distancia de los dos *gaps*, sino que además alteramos las interacciones de la proteína con la cadena molde (**Figura 20**, asteriscos).

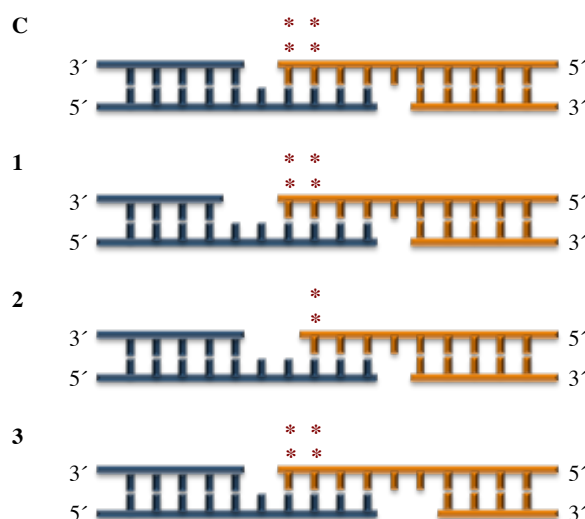


Figura 20. Esquema de las variaciones estudiadas. C: control de la conexión de 4 pb. Los números 1, 2 y 3 representan las 3 variaciones analizadas. Los asteriscos en rojo representan el número de interacciones de los residuos de la polimerasa con las bases molde sobre las que se encuentran.

Al analizar la inserción únicamente del nucleótido correcto ddGTP, observamos que Pol λ fue capaz de reparar el primer *gap* de manera eficaz en la primera y la tercera variación analizada (**Figura 21A**). Sin embargo, en el segundo caso apenas fue capaz de completar la reacción. Estos resultados ponen de manifiesto la importancia de la conexión: la sinapsis debe ser de 4 pb para que la reacción sea eficiente, pudiendo ser los *gaps* de más de un nucleótido. Como hemos dicho anteriormente, cuando la sinapsis es de 4 pb las interacciones entre la proteína y la cadena molde favorecen la reacción. En la segunda variación estudiada perdemos dos de las interacciones con el molde provocando además que el segundo *gap* sea mayor (**Figura 20**), por lo que parece lógico que la reacción se vea desfavorecida. En la tercera variación, el *gap* formado es de 2 nucleótidos por lo que

quisimos saber si Polλ era capaz de repararlo por completo (**Figura 21B**). La utilización de dGTP en lugar de ddGTP, nos permitió ver que Polλ lo inserta hasta 2 veces, quedando la rotura reparada. A pesar de la diferencia en la eficiencia de reacción en cada variación, encontramos que en las tres situaciones la reparación es fiel, incorporándose sólo el nucleótido correcto ddGTP (**Figura 21C**).

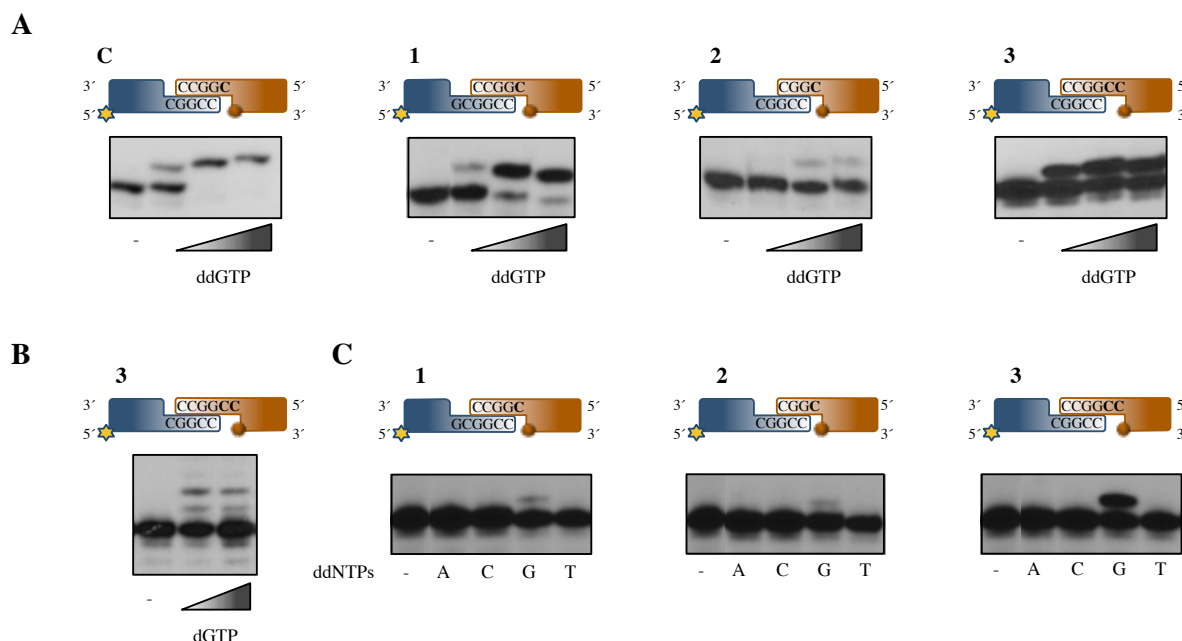


Figura 21. Variaciones en la sinapsis: distancia de los gaps. Las reacciones se llevaron a cabo como se describe en Materiales y Métodos. Se indica con una “c” el caso control, y con número sobre los sustratos cada una de las variaciones. El sustrato marcado (azul) está formado por hibridación del oligonucleótido D3+C con D1 para el control (c) y para las variaciones 2 y 3, y por hibridación de D3+C con D1-1 para la variación 1. El sustrato no marcado (naranja) está formado por hibridación de D4-GC con D2 para el caso control (c) y para la variación 1, por hibridación de D4-C con D2 para la variación 2 y por hibridación de D4-GC con D2-1 para la variación 3. La esfera naranja indica la presencia del grupo 5'P en la cadena *downstream* del sustrato. **A.** Las reacciones se incubaron durante 60 min a 30 °C, en presencia de 500 nM DNA polimerasa, 0,1 mM Mn²⁺ y 10 nM, 100 nM y 1 μM ddGTP para el control, y 100 nM, 1 μM y 10 μM ddGTP para cada una de las variaciones. **B.** La reacción se llevó a cabo como en A en presencia de 1 μM y 10 μM dGTP. **C.** Las reacciones se llevaron a cabo como en A en presencia de 100 nM ddGTP para las variaciones 1 y 3 y 1 μM para la variación 2.

1.6 Imperfecciones en las DSBs

1.6.1 Imperfecciones en el iniciador

Otra de las situaciones fisiológicas que puede ocurrir es que los dos extremos de DNA que deben ser reparados no formen una unión perfecta en la conexión, sino que se produzcan distorsiones como bases desapareadas bien en el extremo de la conexión o en la propia unión, burbujas formadas por bases extra-helicoidales... (Brissett et al., 2007). Polλ es capaz de extender desapareamientos de manera muy eficiente (Picher et al., 2006). La estructura cristalográfica de Polλ en un *gap* de un 1 nucleótido con un apareamiento erróneo dG:dGMP en la zona del iniciador, pone de manifiesto que la estructura global de la proteína no se ve fuertemente alterada. Nos preguntamos si Polλ iba a ser capaz de resolver roturas de doble cadena cuando la conexión no aparea correctamente. Para ello, usamos como sustratos variaciones de los oligonucleótidos D3 y D4 y D3+C y D4-GC que forman conexiones

de 3 y 4 pb respectivamente utilizados con anterioridad. Pudimos también analizar la mínima complementariedad de bases que necesita Pol λ para aceptar distorsiones durante la reacción de NHEJ.

Cuando la conexión es de 3 pb pero el extremo 3' del iniciador queda desapareado, Pol λ no fue capaz de llevar a cabo la reacción (**Figura 22A**, segundo panel). Si la distorsión de la sinapsis es una burbuja causada por una base extra-helicoidal en la posición n-1 o n-2 del iniciador, la reacción solo ocurrió en el segundo caso. (**Figura 22A** tercer y cuarto panel). Además, el hecho de que la base extra esté alejada del extremo 3' iniciador no parece alterar la eficiencia de la reacción. Sin embargo, en una conexión de 4 pb en la que el extremo 3' del iniciador no aparea correctamente con su base molde, Pol λ no fue capaz de reparar ese rotura (**Figura 22B**), independientemente del desapareamiento a extender. Este resultado respalda el obtenido en el caso anterior ya que si ocurriese una recolocación del iniciador quedando su extremo 3' apareado, obtendríamos una conexión de 3 pb con una base extra-helicoidal en posición n-1, y un *gap* de dos nucleótidos que Pol λ no puede resolver (**Figura 22C**).

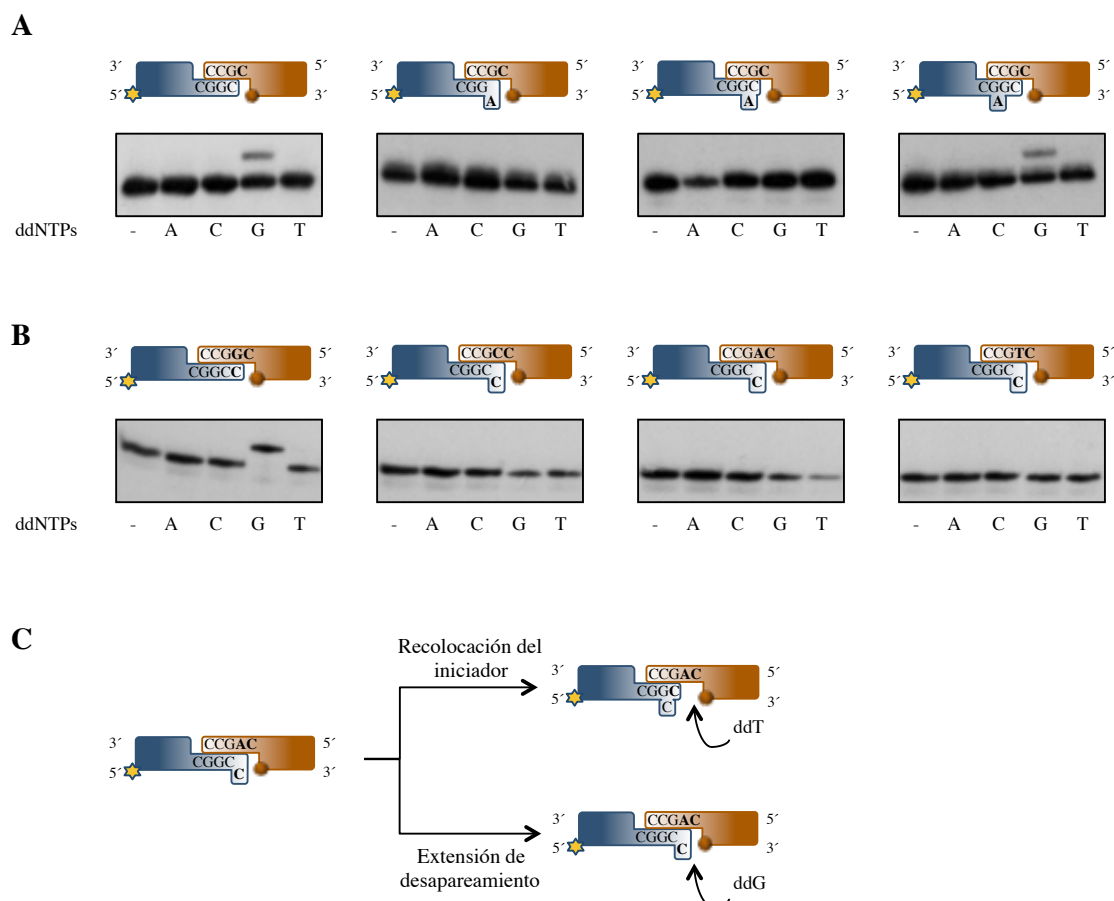


Figura 22. Actividad de Pol λ en conexiones con imperfecciones. **A.** El sustrato marcado (azul) está formado por hibridación de los oligonucleótidos D3, D3-Flap, D3-BB1 y D3-BB2 con D1 y el sustrato no marcado (naranja) por hibridación de D4-C con D2. **B.** El sustrato marcado (azul) está formado por hibridación de los oligonucleótidos D3+C con D1 y el sustrato no marcado (naranja) por hibridación de D4-GC, D4-CC, D4-AC y D4-AT con D2. La esfera naranja indica la presencia del grupo 5'P en la cadena *downstream* del sustrato. Las reacciones se incubaron durante 60 min a 30 °C, en presencia de 0,1 mM Mn²⁺, 100 nM ddNTPs en el caso control (primer panel) y 10 μ M ddNTPs para la extensión de desapareamientos y 500 nM DNA polimerasa. **C.** Esquema de los mecanismos que pueden suceder si el extremo 3' del iniciador no aparea correctamente.

La diferencia en la eficiencia de la reparación por NHEJ en extremos compatibles de 3 y 4 pb observada anteriormente (**Figura 15**) nos hizo preguntarnos si la versatilidad de Polλ aceptando apareamientos erróneos y burbujas en el iniciador era mayor aumentando la conexión. En un sustrato tipo *gap* de 1 nucleótido con extremo 5'P, en los que hay una base extra en distintas posiciones del iniciador (n-1, n-2 y n-3) la eficiencia fue muy alta. Observamos una inserción del 100% a concentraciones bajas de ddGTP (**Figura 23A**). Sin embargo, en un contexto de reparación de NHEJ con extremos complementarios de 4 pb y burbujas en el iniciador a diferentes distancias del extremo 3' del iniciador, la eficiencia fue muy inferior al caso control. Polλ solo fue capaz de llevar a cabo la reacción cuando la base extra está en posición n-2 o n-3, siendo incapaz de reparar la rotura cuando la burbuja se encuentra más cerca del extremo 3' del iniciador (n-1) (**Figura 23B**). La inserción en estos casos de produjo de manera fiel, insertándose únicamente el nucleótido correcto ddGTP frente a la base molde dC (**Figura 23C**).

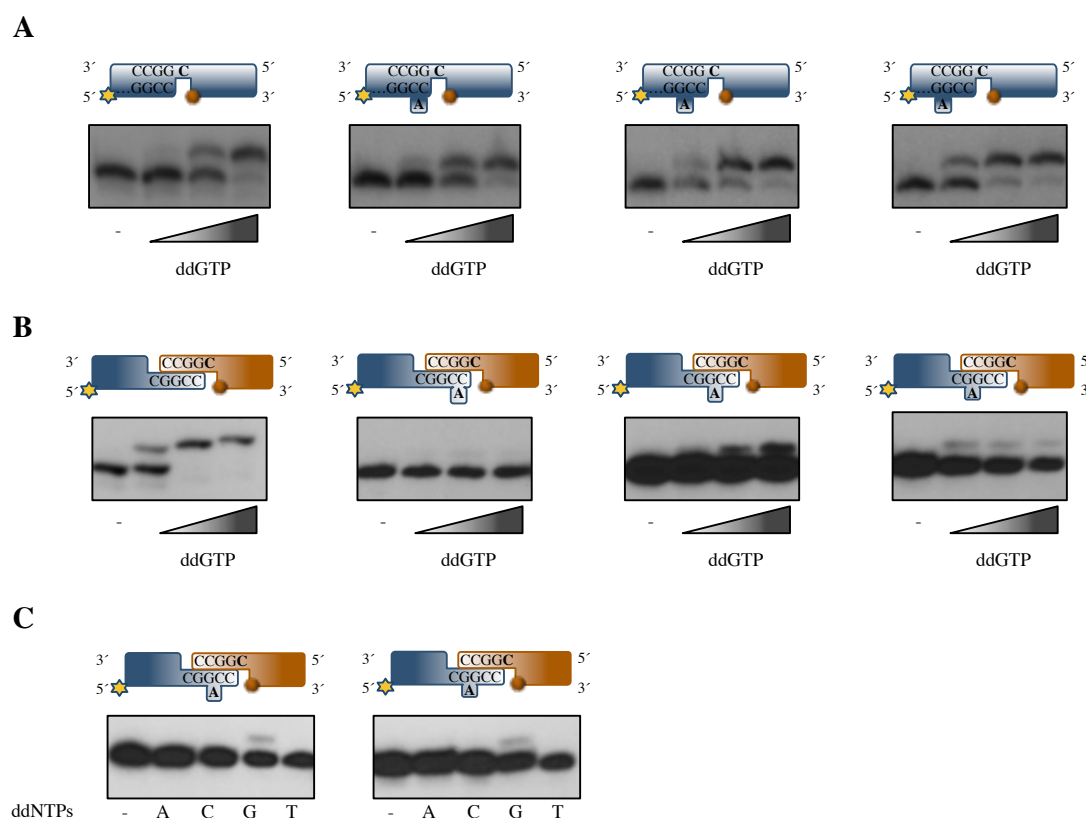


Figura 23. NHEJ en sustratos con bases extra en el iniciador. A. Actividad de Polλ en un GAP1P con burbujas en el iniciador en posiciones n-1, n-2 y n-3. El sustrato está formado por hibridación del oligonucleótido D3+C, D3+C-BB1, D3+C-BB2 y D3+C-BB3 con T-NHEJ-4pb y D2. La reacción se llevó a cabo como se describe en Materiales y Métodos a 30 °C, durante 20 min, en presencia de 2,5 mM Mg²⁺, 50 nM DNA polimerasa y 0,1 nM, 1 nM y 10 nM ddGTP en el caso control (panel de la izquierda) y 1 nM, 10 nM, y 100 nM en los sustratos con bases extra. La esfera naranja indica la presencia del grupo 5'P en la cadena *downstream* del sustrato. **B.** El sustrato marcado (azul) está formado por hibridación de los oligonucleótidos D3+C, D3+C-BB1, D3+C-BB2 y D3+C-BB3 con D1 y el sustrato no marcado (naranja) por hibridación de D4-GC, con D2. La esfera naranja indica la presencia del grupo 5'P en la cadena *downstream* del sustrato. Las reacciones se incubaron durante 60 min a 30 °C, en presencia de 0,1 mM Mn²⁺, 500 nM DNA polimerasa y 10 nM, 100 nM y 1 μM ddGTP en el caso control (primer panel) y 100 nM, 1 μM y 10 μM ddGTP en los sustratos con bases extra. **C.** El sustrato marcado (azul) está formado por hibridación de los oligonucleótidos D3+C-BB2 y D3+C-BB3 con D1 y el sustrato no marcado (naranja) por hibridación de D4-GC, con D2. Las reacciones se llevaron a cabo de la misma manera que en B en presencia de 1 μM ddNTPs.

Cuando la distorsión que ocurre en el iniciador es un desapareamiento entre alguna de sus bases y el molde y el sustrato es el óptimo para Pol λ (GAP1P), la reacción vuelve a ser muy eficiente, independientemente de que el desapareamiento se encuentre en posición n-1 o n-2 (**Figura 24A**). En un contexto de reparación de NHEJ, la eficiencia de la reacción fue de nuevo muy baja, requiriéndose además que la distorsión no esté cercana al extremo 3' del iniciador (**Figura 24B**). Cuando el desapareamiento se sitúa en n-2, Pol λ completa la reacción fielmente (**Figura 24C**).

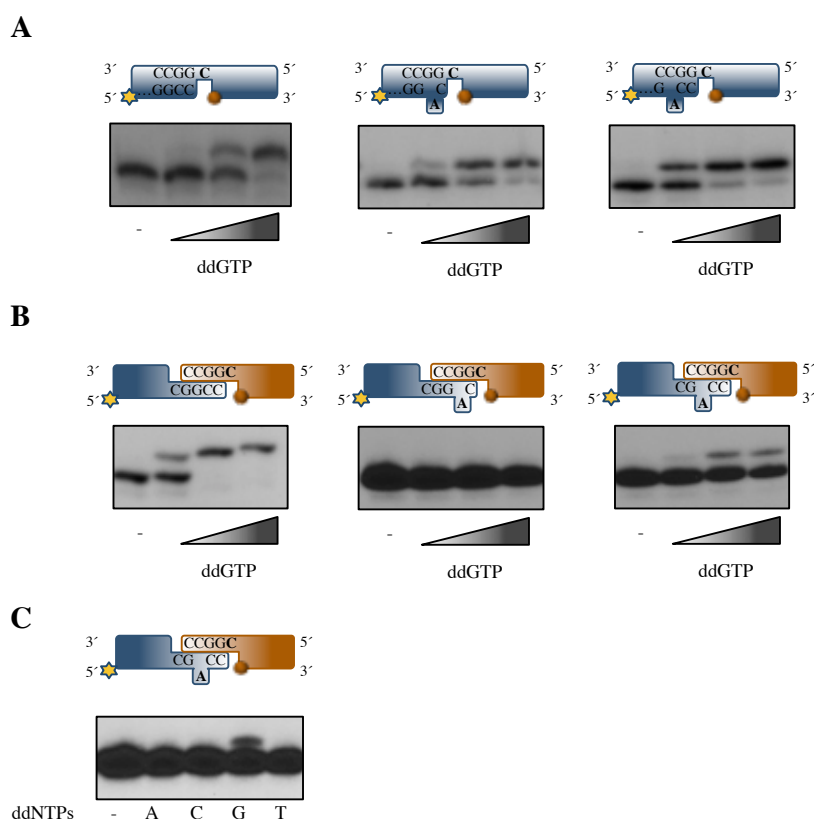


Figura 24. NHEJ en sustratos con desapareamientos en el iniciador. **A.** Actividad de Pol λ en un GAP1P con desapareamientos en el iniciador en posiciones n-1 y n-2. El sustrato está formado por hibridación del oligonucleótido D3+C, D3+C-MM1 y D3+C-MM2 con T-NHEJ-4pb y D2. La reacción se llevó a cabo como se describe en Materiales y Métodos a 30 °C, durante 20 min, en presencia de 2,5 mM Mg $^{2+}$, 50 nM DNA polimerasa, y 0,1 nM, 1 nM y 10 nM ddGTP en el caso control (panel de la izquierda) y 1 nM, 10 nM, y 100 nM en los sustratos con bases extra. La esfera naranja indica la presencia del grupo 5'P en la cadena *downstream* del sustrato. **B.** El sustrato marcado (azul) está formado por hibridación de los oligonucleótidos D3+C, D3+C-MM1 y D3+C-MM2 con D1 y el sustrato no marcado (naranja) por hibridación de D4-GC, con D2. La esfera naranja indica la presencia del grupo 5'P en la cadena *downstream* del sustrato. Las reacciones se incubaron durante 60 min a 30 °C, en presencia de 0,1 mM Mn $^{2+}$, 500 nM DNA polimerasa y 10 nM, 100 nM y 1 μ M ddGTP en el caso control (primer panel) y 100 nM, 1 μ M y 10 μ M ddGTP en los sustratos con bases extra. **C.** El sustrato marcado (azul) está formado por hibridación de los oligonucleótidos D3+C-MM2 con D1 y el sustrato no marcado (naranja) por hibridación de D4-GC, con D2. Las reacciones se llevaron a cabo de la misma manera que en B en presencia de 1 μ M ddNTPs.

1.6.2 Imperfecciones en el molde

Cuando se trata de un sustrato tipo *gap* de 2 nucleótidos con extremo 5'P, Pol λ es capaz de “contar” correctamente las bases y copiar en primer lugar la base posición T $_1$ del molde y posteriormente la base posición T $_2$. Para ello mediante un mecanismo de “*scrunching*”, la base en posición T $_2$ se recoloca extra-helicoidalmente (Garcia-Diaz et al., 2009) (**Figura 25B**). Puede ocurrir

que la base molde T_1 sea igual que la base en posición T_0 , apareada con el extremo 3' del iniciador. En este caso, mediante el mecanismo de “*slippage*” definido por primera vez por Streisinger (Streisinger et al., 1966), la base T_1 del molde se desliza apareando con el iniciador y quedando una base extra-helicoidal *upstream* respecto al extremo del iniciador (Figura 25C). Se ha demostrado que la alta tasa de deleciones provocadas por Polλ, es debida a su capacidad de polimerizar en este tipo de sustratos (Garcia-Diaz et al., 2006). Por ello, quisimos completar el estudio de la versatilidad de Polλ tolerando distorsiones en la conexión, analizando el efecto que podrían tener sobre la reacción de NHEJ diferentes distorsiones en la zona del molde.

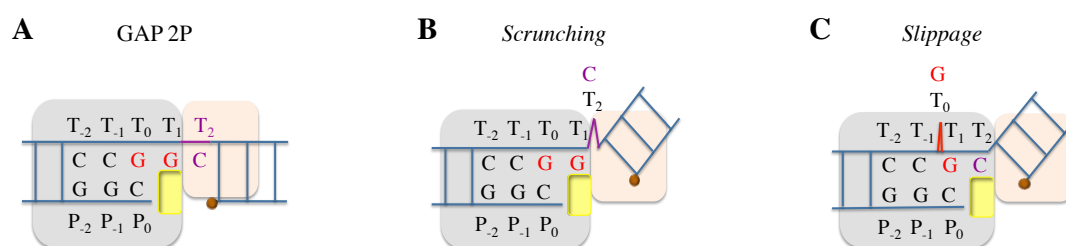


Figura 25. Polimerización de polimerización en sustratos de DNA tipo GAP2P. A. Representación esquemática de la unión de Polλ a un sustrato de DNA con una *gap* de 2 nucleótidos. B. Mecanismo de *scrunching* por el que la base en posición T_2 queda fuera de la doble hélice. C. Mecanismo de *slippage* en el que la base en posición T_0 se desliza y queda fuera de la doble hélice apareando la base en posición T_1 con el extremos del iniciador. En todos lo casos la polimerasa se representa en gris y naranja claro. En amarillo se muestra el sitio catalítico donde tiene lugar la polimerización.

Cuando la complementariedad en la unión es de 3 pb y el *gap* a rellenar de 2 nucleótidos, encontramos que Polλ no fue capaz de completar la reacción (Figura 26A). Por tanto, no tuvo lugar ninguno de los dos mecanismos anteriormente descritos, ya que no se produjo ni la inserción de ddCTP lo que hubiera implicado un proceso de *scrunching*, ni de ddGTP que hubiera significado un proceso de *slippage* (Figura 26B).

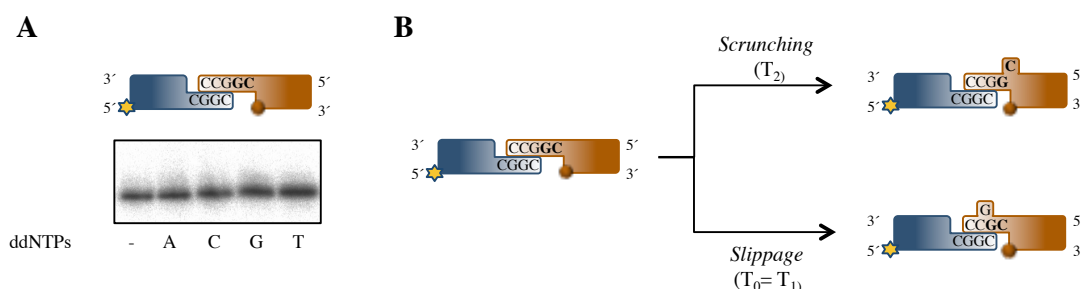


Figura 26. NHEJ en sustratos con un molde que deja *gaps* de más de un nucleótido. A. El sustrato marcado (azul) está formado por hibridación del oligonucleótido D3 con D1 y el sustrato no marcado (naranja) por hibridación de D4-GC con D2. La reacción se llevó a cabo como se describe en Materiales y Métodos a 30 °C, durante 60 min, en presencia de 0,1 mM Mn^{2+} , 500 nM DNA polimerasa y 10 μ M ddNTPs. La esfera naranja indica la presencia del grupo 5'P en la cadena *downstream* del sustrato. B. Esquema de los mecanismos de recolocación del molde para obtener un *gap* de un solo nucleótido.

Puede ocurrir que las conexiones no sean perfectas y que haya bases extra en el DNA molde. Estas bases desapareadas podrían situarse más o menos cerca del extremo 3' del iniciador, es decir del *gap* a reparar. Cuando las conexiones estudiadas son de 3 pb con bases extra presentes en la zona del molde (**Figura 27A**), Pol λ no fue capaz de completar la reacción de reparación (no mostrado). Cuando la sinapsis es de 4 pb (**Figura 27B**) pero con la misma de situación de bases extra en la zona del molde, tampoco se obtuvo reacción de NHEJ (no mostrado). Sin embargo, en la conexión óptima de 4 pb, en la que el apareamiento de 3 de ellas es perfecto, quedando solo una base desapareada lo más lejos posible del extremo 3' del iniciador (**Figura 27C**), Pol λ sí fue capaz de completar esta reacción de una forma eficiente y fiel. Recordemos que Pol λ interacciona con las bases molde en posición T₂ y T₃ por lo que aunque la base T₃ se encuentre desapareada, es posible que pueda ser estabilizada y por tanto la reparación pueda tener lugar. Sin embargo, las bases extra podrían provocar una distorsión de la estructura mucho mayor y permitir a Pol λ reunir ambos extremos del DNA correctamente para que la reacción tenga lugar.

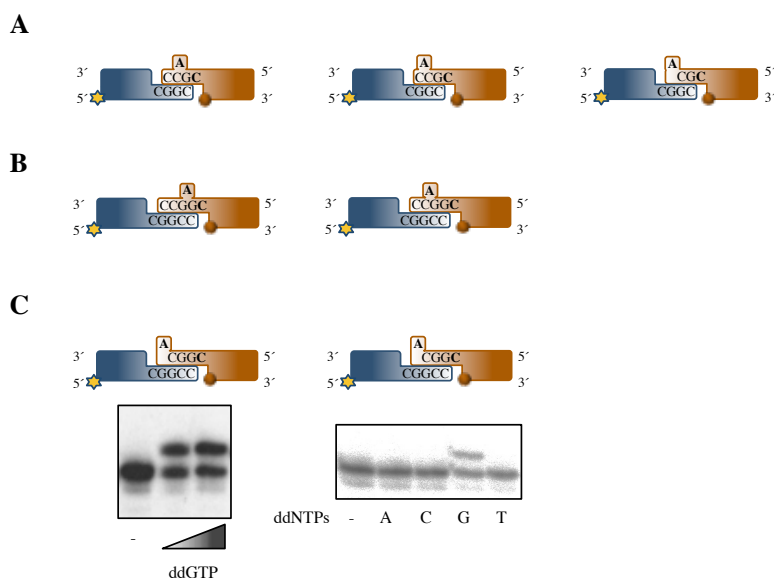


Figura 27. NHEJ en sustratos con distorsiones en el molde. **A.** Esquema de los extremos de DNA conexiones de 3 pb analizados. **B.** Esquema de los extremos de DNA conexiones de 4 pb analizados. **C.** El sustrato marcado (azul) está formado por hibridación del oligonucleótido D3+C con D1 y el sustrato no marcado (naranja) por hibridación de D4-GC-Flap con D2. La reacción se llevó a cabo como se describe en Materiales y Métodos a 30 °C, durante 60 min, en presencia de 0,1 mM Mn²⁺, 500 nM DNA polimerasa y 0,1 μ M y 1 μ M ddGTP (panel de derecha) y 0,1 μ M ddNTPs (panel de la izquierda). La esfera naranja indica la presencia del grupo 5'P en la cadena *downstream* del sustrato.

En resumen, el análisis sobre la tolerancia de Pol λ a la existencia de imperfecciones en la sinapsis, demuestra que aquellas que se encuentran en la zona del iniciador son toleradas siempre que queden 2 pb perfectamente apareados en el extremo. En conexiones de 4 pb, Pol λ completa la reacción cuando la imperfección es o bien una base extra, o bien una base mal apareada. Las imperfecciones en la zona del molde solo son toleradas cuando se sitúan lo más lejos posible del *gap* que se va a reparar.

1.7 Extremos dañados. Presencia de 8oxodG en la rotura

El estrés oxidativo al que la célula está continuamente expuesta provoca la aparición de bases modificadas en el DNA como la 7,8-dihidro-8-oxoguanina (8oxodG), así como la modificación del *pool* de desoxinucleótidos libres. Estas modificaciones son habituales en la célula y presentan gran relevancia por su relación con la aparición de mutaciones espontáneas en el DNA implicadas en procesos de cáncer y envejecimiento celular. La base modificada 8oxodG presenta dos conformaciones. En su conformación *anti* es capaz de aparear con la base dC dando lugar a un apareamiento de Watson y Crick. La conformación *syn* facilita el apareamiento de Hoogsteen con la base dA (**Figura 28**). Debido a este apareamiento erróneo, si este daño en el DNA no es reparado, provocará mutaciones de transversión G:C a T:A (Moriya, 1993).

En los últimos años se ha analizado en profundidad el comportamiento de DNA polimerasas de diferentes familias frente a la presencia de 8oxodG en el DNA molde. Los sustratos preferidos a la hora de polimerizar frente a 8oxodG son dCTP y dATP, seguidos de dGTP y dTTP. Sin embargo, la relación de incorporación dCTP/dATP varía en función de las polimerasas, llegando a proponerse tres grupos (Brown et al. 2007): el primero formado por polimerasas con una relación dCTP/dATP > 10, el segundo dCTP/dATP 1-10 y por último dCTP/dATP < 1. Las DNA Polimerasas Polλ y Polβ forman parte del segundo grupo presentando una relación dCTP:dATP próxima a 1. Un estudio reciente (Batra et al. 2012) muestra que Polβ es capaz de estabilizar ambas conformaciones (*syn* y *anti*) en su centro activo. Tanto los complejos binarios como los ternarios ponen de manifiesto la capacidad de Polβ de estabilizar los dos apareamientos 8oxodG:dA y 8oxodG:dC. Las estructuras cristalográficas obtenidas revelan además que la extensión de ambos pares de bases es también estable. Por su parte, la DNA polimerasa Polμ, es capaz de insertar tanto dATP como dCTP en frente de 8oxodG (Martin et al., 2013).

El comportamiento de Polλ frente a la presencia de modificaciones químicas de la base nitrogenada guanina en el DNA ha sido ampliamente estudiada en la última década. Como hemos mencionado anteriormente, Polλ incorpora tanto dATP como dCTP frente 8oxodG en el DNA molde. La fidelidad de esta reacción aumenta en presencia de proteínas auxiliares como PCNA o RPA (Maga et al., 2007). Polλ es además capaz de extender los pares formados 8oxodG:dA y 8oxodG:dC, siendo la extensión de éste más eficientemente que la del par no dañado G:C (Picher & Blanco, 2007).

En solución y a pH fisiológico, es la conformación *syn* del 8oxodGTP la que está favorecida (Jang et al., 2002). Sin embargo, la inserción de 8oxodGTP frente a dA o dC en el DNA molde varía de unas polimerasas a otras incluso dentro de la misma familia. Esto sugiere que las propiedades de los centros activos de las diferentes polimerasas juegan un importante papel a la hora de incorporar 8oxodGTP en alguna de sus conformaciones. Se ha descrito que tanto Polλ como Polβ prefieren incorporar 8oxodGTP frente a dA (Brown et al., 2007).

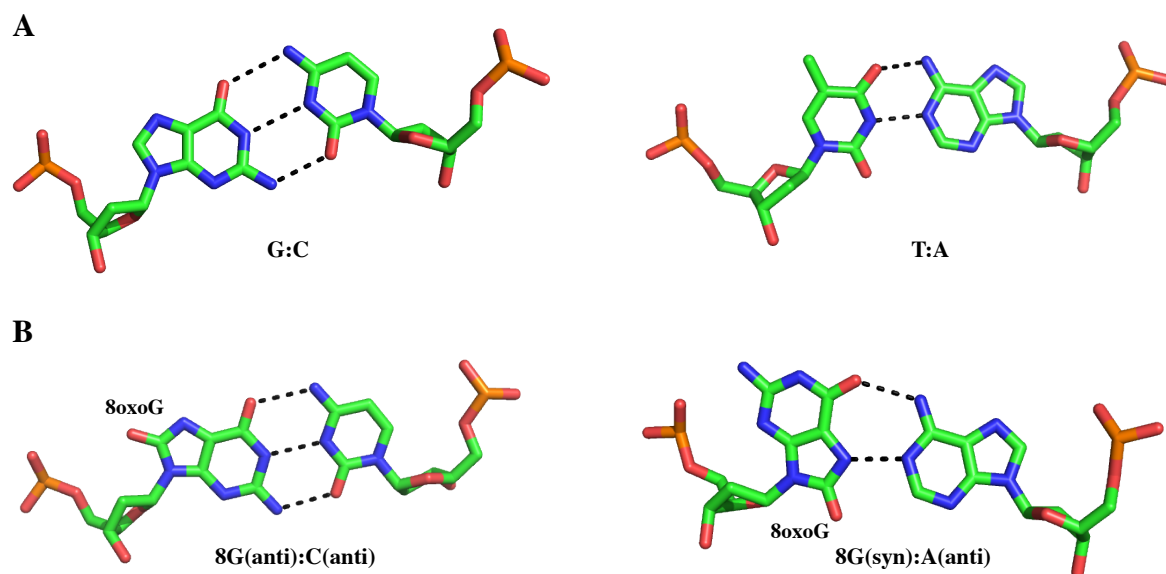


Figura 28. Estructura de los apareamientos posibles de la base modificada 8oxodG. A. Apareamiento de Watson y Crick entre las bases dG y dC (PDB id 1U48) y dT y dA (PDB id 178D). Los puentes de hidrógeno entre las bases se representan como líneas de puntos. B. Apareamiento entre las bases 8oxodG y dC (PDB id 1U48) y 8oxodG y dA (PDB id 178D). Los puentes de hidrógeno entre las bases se representan como líneas de puntos. Para realizar la figura se ha utilizado el programa MacPyMOL.

Fisiológicamente podemos encontrar bases modificadas en las roturas de doble cadena. Por ello, quisimos estudiar el comportamiento de Pol λ copiando 8oxodG como molde o extendiendo los pares que esta base puede formar en un contexto de NHEJ.

1.7.1 Presencia de 8oxodG en el DNA molde. Extensión de los pares formados 8oxodG:dA y 8oxodG:dC

Durante la tolerancia al daño en el DNA hay dos pasos fundamentales: el primero de ellos es la inserción frente a la base dañada; el segundo, la extensión del par formado. Para analizar si Pol λ es capaz de tolerar y copiar la base 8oxodG durante el primer paso de la reparación por NHEJ, realizamos un ensayo donde los sustratos de DNA forman una conexión de 4 pb. Si la base presente en el molde no está dañada (dG), Pol λ insertó únicamente el nucleótido correcto dCTP (**Figura 29A** panel de la derecha). Sin embargo, si la base del molde es 8oxodG, Pol λ fue capaz de tolerar el daño e insertar tanto dATP como dCTP (**Figura 29A** panel de la izquierda), al igual que ocurre en un contexto de reparación con un sustrato de DNA formado por un *gap* de 1 nucleótido (Picher & Blanco, 2007).

El análisis del segundo paso de la tolerancia al daño nos lleva a comparar la eficiencia de la extensión de los pares dañados, 8oxodG:dC y 8oxodG:dA, frente a la extensión de los pares no dañados, dG:dC y dT:dA respectivamente. En el mismo contexto de NHEJ con sustratos de DNA 3' protuberantes con una conexión de 4 pb, la eficiencia de la extensión difiere entre los distintos pares.

Así, aunque la extensión del par 8oxodG:dC fue muy eficiente, no superó a la del par correcto dG:dC (**Figura 29B**). Por su parte, la extensión del par 8oxodG:dA fue comparable a la del par correcto dT:dA. (**Figura 29C**). Sin embargo, fue menos eficiente que la del par 8oxodG:dC, por lo que Polλ presenta un comportamiento fiel durante la extensión de los pares de bases que contienen esta lesión.

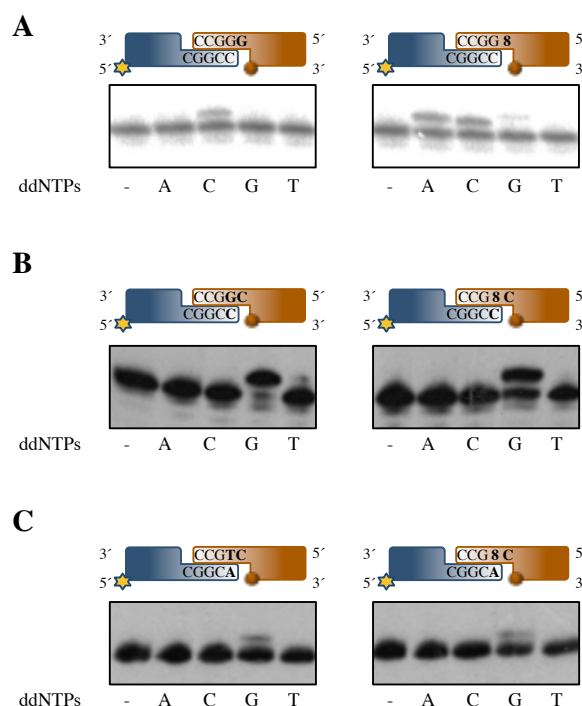


Figura 29. Presencia de 8oxodG en DNA molde durante la reparación de DSBs. **A.** Inserción frente a 8oxodG en el molde. El sustrato marcado (azul) está formado por hibridación de los oligonucleótidos D3+C con D1 y el sustrato no marcado (naranja) por hibridación de D4-GC y D4-8oxoG con D2, respectivamente. **B.** Extensión de los pares dG:dC y 8oxodG:dC. El sustrato marcado (azul) está formado por hibridación de los oligonucleótidos D3+C con D1 y el sustrato no marcado (naranja) por hibridación de D4-GC, D4-8oxoGC, respectivamente con D2. **C.** Extensión de los pares dT:dA y 8oxodG:dA. El sustrato marcado (azul) está formado por hibridación de los oligonucleótidos D3+A con D1 y el sustrato no marcado (naranja) por hibridación de D4-TC, D4-8oxoGC, respectivamente con D2. La esfera naranja indica la presencia del grupo 5'P en la cadena *downstream* del sustrato. En todos los casos, las reacciones se incubaron durante 60 min a 30 °C, en presencia de 0,1 mM Mn²⁺, 1 μM ddNTPs y 500 nM DNA polimerasa.

1.7.2 Inserción de 8oxodGTP

Otra de las situaciones que podemos encontrar en la célula es la presencia de 8oxodGTP libre, que puede ser incorporado por las polimerasas durante la replicación y la reparación del DNA. Nos preguntamos cuál era la eficiencia de incorporación mediada por Polλ de 8oxodGTP libre frente a dC y dA, en relación a la inserción de los nucleótidos correctos (dGTP y dTTP) frente a cada una de las bases molde. Solo detectamos inserción de 8oxodGTP frente a dA, no frente a dC, (**Figura 30**), lo que supone un comportamiento mutagénico, insertando 8oxodGTP frente a la base errónea. Sin embargo, la eficiencia de inserción de 8oxodGTP frente a dA, no fue mayor que la inserción correcta de dTTP, por lo que podemos decir que ante la base molde dA, Polλ reparará el DNA de forma no mutagénica, prefiriendo la incorporación de ddTTP antes que de 8oxodGTP.

2

El “nail” de Polλ: estabilización de bases extra-helicoidales y relevancia en NHEJ

2.1 Polλ posee en su dominio *pulgar* un *loop* característico relevante para su función

La gran cantidad de estructuras cristalográficas de las polimerasas de la Familia X resueltas en los últimos años, nos proporciona información sobre su comportamiento a la hora de seleccionar el nucleótido correcto ante diferentes situaciones en el DNA. Sustituciones de base o inserciones/deleciones (*indels*) en el DNA pueden causar importantes mutaciones. De las cuatro polimerasas de la Familia X, Polβ es la más fiel. Polμ destaca por provocar sustituciones y errores en la pauta de lectura. TdT es un caso especial a la hora de hablar de fidelidad, al llevar a cabo una síntesis independiente de molde (revisado por Kunkel, 2004; Yamtich & Sweasy, 2010). Polλ presenta la mayor tasa de error de deleciones de base en pequeñas secuencias repetidas (Bebenek et al., 2003). De hecho, la tasa de error de *indels* de las DNA polimerasas es mayor en secuencias repetidas, que forman el 50% del genoma humano (Lander et al., 2001). Este hecho encuentra su explicación en la ya mencionada hipótesis de Streisinger (Streisinger et al., 1966), basada en que las inserciones y deleciones en el DNA son el resultado de un mecanismo de *slippage* durante la polimerización. Este proceso se basa en permitir la presencia de una o varias bases extra-helicoidales *upstream* del centro activo de la polimerasa. Estas bases “distorsionadas” pueden facilitar el apareamiento correcto del extremo del iniciador en posiciones alternativas, lo que permite continuar la síntesis de DNA.

Polλ es muy eficiente estabilizando estas bases extra-helicoidales en el DNA, y continúa la polimerización generando un alto nivel de *indels* (inserciones/deleciones) (Bebenek et al., 2003b; Garcia-Diaz et al., 2006). Análisis comparativos estructurales y de secuencia han permitido identificar un *loop* en el subdominio *pulgar* presente en Polλ, entre las láminas β 7 y 8, y ausente en el resto de polimerasas de la misma familia. Este *loop* ha sido identificado como el responsable de la estabilización de las bases extra-helicoidales mediante su interacción con un residuo concreto, la Lys⁵⁴⁴ (Garcia-Diaz et al., 2006). La Arg⁵³⁸, también presente en este *loop*, interacciona con las bases del molde T₀ y T₋₁. El resto de residuos se sitúan sobre el DNA como si “plancharan” la zona *downstream* del molde, estabilizándolo para que pueda tener lugar la polimerización. La ausencia de este *loop* compromete la actividad de Polλ, lo que refleja su importancia en el cambio conformacional que se produce durante la unión del nucleótido (Garcia-Diaz et al., 2005). Además la mutación K544A provoca una disminución en la tasa de error de deleciones en secuencias repetidas (Garcia-Diaz et al., 2006). Por ser una extensión del subdominio *pulgar* hemos llamado a este *loop* “*nail*” (uña). Cabe también destacar que el *nail* no es un elemento rígido, sino que cambia de conformación en complejo binario y ternario, a la vez que el DNA se mueve hacia el centro activo (Figura 31).

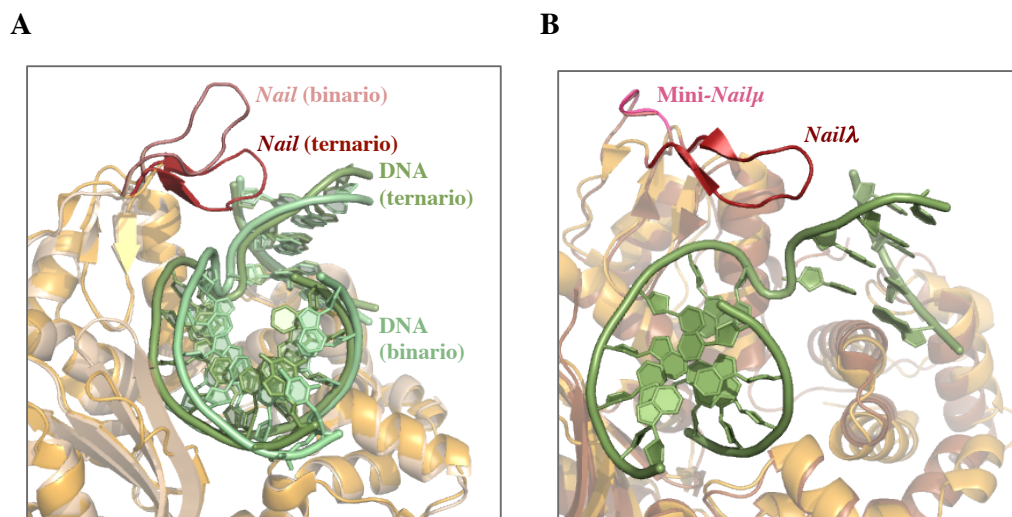


Figura 31. Papel de la región del *nail* en la función de Polλ. **A.** Superposición estructural de Polλ en complejo binario (PDB id 1XSL; marrón claro) y complejo ternario (PDB id 1XSL, naranja). Se destaca la región del *nail* en ambas estructuras observándose el cambio estructural que sufre en la transición desde el complejo binario al ternario. **B.** Superposición estructural de Polλ (naranja) y Polμ (marrón) en complejo ternario (PDB id 1XSN y 2IHM). Se destaca la región del *nail* en ambas proteínas observándose la diferencia de tamaño entre ambos.

El hecho de que las interacciones del *nail* con el esqueleto de fosfato de la hebra molde se producen también en sustratos de DNA perfectamente alineados y su ausencia de Polμ, predice su importancia en las características particulares de Polλ. Probablemente su papel no se limite a la estabilización de bases extra en el DNA en sustratos tipo *gap*, sino que las diferentes funciones de Polλ y Polμ y la especificidad de ambas durante el proceso de NHEJ vengan determinadas por diferencias estructurales como ésta.

Como muestra la **figura 32** el *nail* de Polλ está formado por 12 aminoácidos comprendidos entre la Val⁵³⁶ y la Pro⁵⁴⁸. El mini-*nail* de Polμ lo forman únicamente 3 aminoácidos (Glu⁴⁶⁵, Gln⁴⁶⁶ y Lys⁴⁶⁷). Para poder profundizar en las diferencias estructurales entre Polλ y Polμ que hacen que sus funciones en NHEJ no sean redundantes hemos llevado a cabo un intercambio de los *nails* de estas polimerasas, es decir, hemos cambiado el *nail* de Polλ por el mini-*nail* de Polμ. Sin embargo, para no alterar aún más la estructura del subdominio *pulgar* de la proteína, hemos ampliado la zona de intercambio como se muestra en la **figura 32**. Así, obtenemos una proteína quimérica (Polλ(Nailμ)) en la que un total de 27 aminoácidos de Polλ han sido sustituidos por 17 de Polμ.

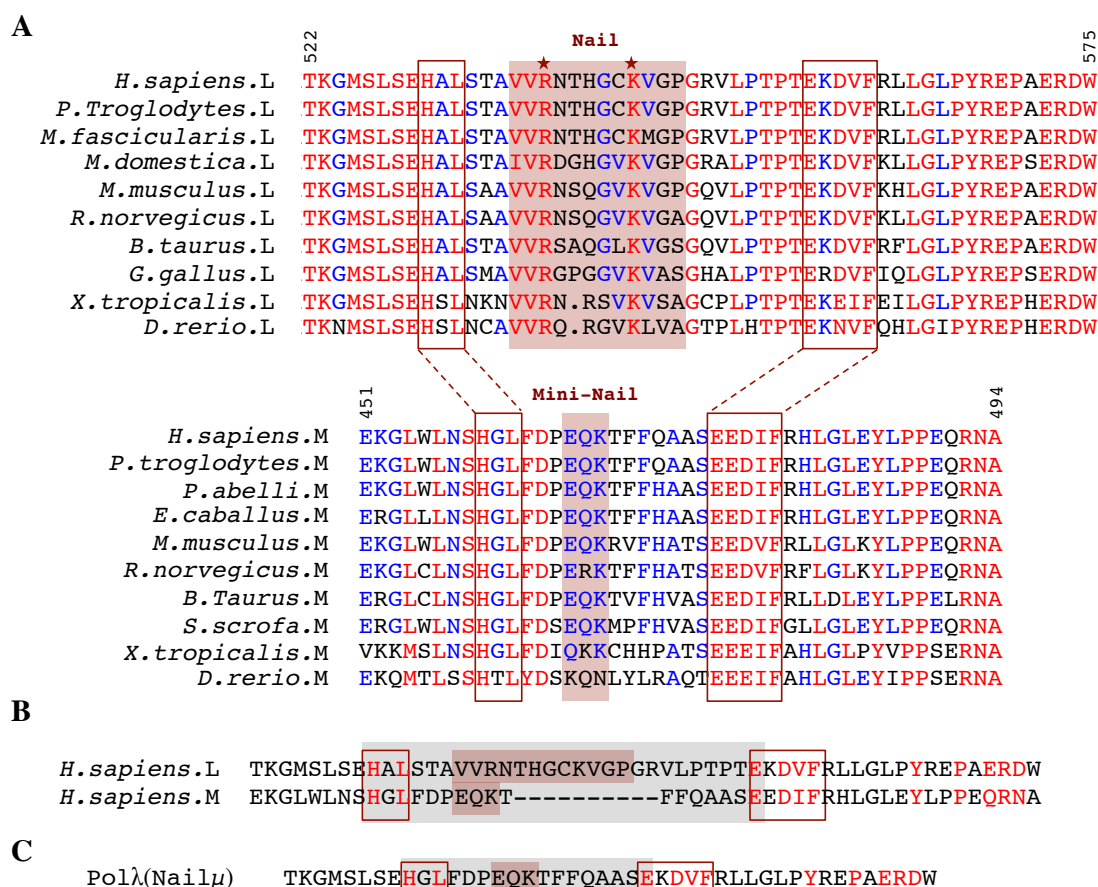


Figura 32. Análisis de secuencia del dominio nail de Polλ y Polμ. **A.** Comparación de secuencias de diferentes especies de la región del nail de Polλ (arriba) y de Polμ (abajo). Es un dominio conservado evolutivamente. En Polλ se marcan con un asterisco dos de los residuos más importantes de esta región, la Arg⁵³⁸ y la Lys⁵⁴⁴. El recuadro con fondo rojo indica la secuencia estricta del nail en ambas polimerasas. En la parte superior se indica el número de residuos respecto a las secuencias de Polλ y Polμ en humanos. **B.** Alineamiento de la región del nail de Polλ y Polμ humanas. El recuadro con fondo rojo indica la secuencia estricta del nail en ambas polimerasas, mientras que el recuadro con fondo gris indica la región intercambiada. **C.** Secuencia de la región del nail de la proteína quimérica obtenida Polλ(Nailμ). El recuadro con fondo rojo indica la secuencia estricta del nail de Polμ, mientras que el recuadro con fondo gris indica la región intercambiada.

2.2 Capacidad de unión de Polλ(Nailμ) al DNA

La obtención de la proteína Polλ(Nailμ) se llevó como se describe en Materiales y Métodos. A pesar de ser una proteína quimérica, no se observaron problemas de expresión o solubilidad.

Tras obtener la proteína purificada, lo primero que nos preguntamos fue si la pérdida de la región del nail afectaba gravemente la unión de la proteína al DNA. Como hemos mencionado anteriormente, en complejo binario el nail no establece interacciones con el DNA, encontrándose en una posición alejada de él. Los residuos Tyr⁵⁰⁵, Arg⁵¹⁷ y Lys⁵²¹, que sí interaccionan con la hebra molde en complejo E:DNA (Figura 33A), están también presentes en Polλ(Nailμ). Sin embargo, podría ocurrir que al sustituir el nail de Polλ por el de Polμ estuviéramos alterando algo más que esta región de la proteína y por tanto su capacidad de interacción con el DNA. Para comprobarlo llevamos a cabo un ensayo de retardo en gel o EMSA como se describe en Materiales y Métodos en un sustrato tipo

GAP1P. Polλ(Nailμ) fue capaz de generar un complejo estable E:DNA, aunque a bajas dosis de proteína la banda de retraso correspondiente al complejo E:DNA es menos intensa en el caso de Polλ(Nailμ), que con la Polλ WT (**Figura 33B**, carriles 2 y 5). Además, las bandas que presentan un mayor retraso, marcadas con * se forman de igual manera con Polλ WT y Polλ(Nailμ), aunque con ligeras diferencias de intensidad y movilidad, que podrían ser debidas a la variación de secuencia intrínseca a la quimera. Estos súper-complejos pueden ser consecuencia de un evento de dimerización que favoreciese la unión de dos moléculas de proteína por cada molécula de DNA. Podemos por tanto concluir que la pérdida del *nail* no compromete seriamente la formación del complejo binario E:DNA.

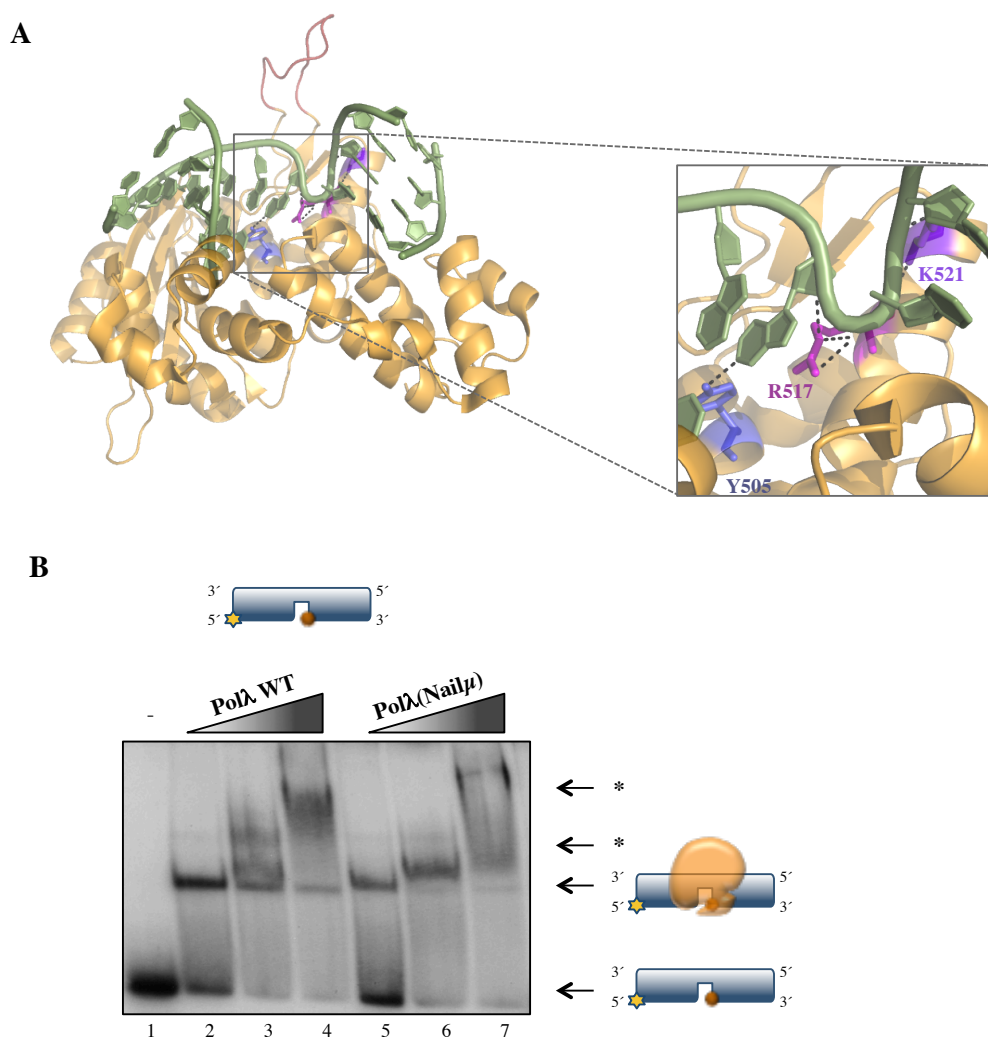


Figura 33. Polλ(nailμ) presenta una unión estable en un gap de un nucleótido con un extremo 5'P. **A.** Representación en *cartoon* del complejo binario de Polλ (PDB id 1XSL). La región del *nail* se destaca en rojo. En la parte derecha se detallan las interacciones de los residuos Y505, R517 y K521 con el DNA. **B.** Ensayo de movilidad en gel (*EMSA*) para medir la interacción de Polλ(Nailμ) con el DNA. La reacción se llevó a cabo como se describe en Materiales y Métodos empleando el sustrato indicado, a 30 °C durante 15 min. Las dosis de las DNA polimerasas son: 300 nM, 600 nM y 1,2 μM. Tras la electroforesis a 4 °C, los geles se secaron y se revelaron por autorradiografía. Los diferentes complejos formados se describen con detalle en el texto.

2.3 La proteína quimérica Polλ(Nailμ) responde a la presencia del grupo 5'P y presenta un comportamiento fiel

Tras verificar que la unión al DNA es estable, quisimos comprobar si Polλ(Nailμ) es activa y estudiar el tipo de síntesis que lleva a cabo en diferentes sustratos de DNA. Tanto en presencia de iones Mg^{2+} como Mn^{2+} , Polλ(Nailμ) es activa y responde a la presencia del grupo 5'P, siendo su síntesis más procesiva en este sustrato (**Figura 34B y C**). Sin embargo, en presencia de iones Mg^{2+} encontramos que en los sustratos molde/iniciador y GAP5OH la actividad de Polλ(Nailμ) es ligeramente inferior a la de Polλ (**Figura 34B**).

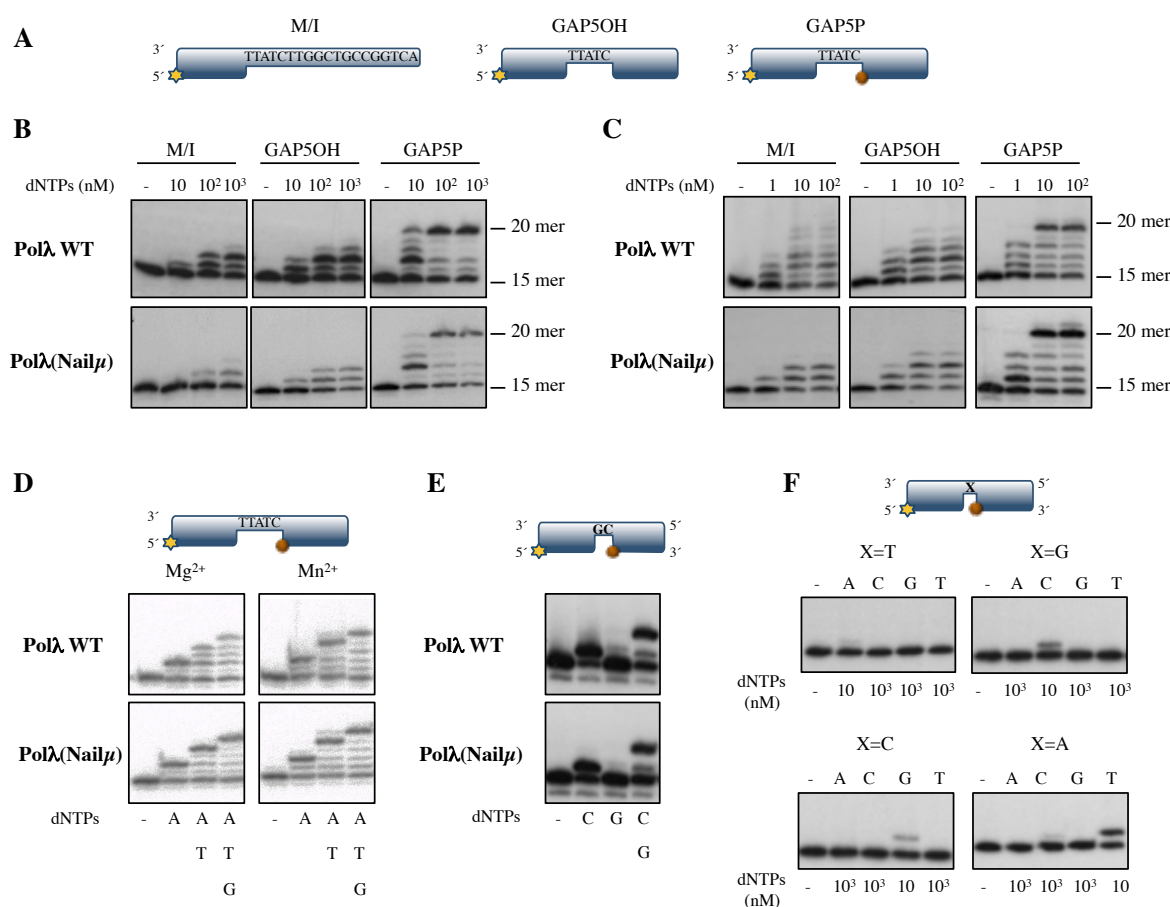


Figura 34. Actividad de Polλ(Nailμ) en diferentes sustratos. Las reacciones se llevaron a cabo como se describe en Materiales y Métodos en presencia de 50 nM de proteína, a 30 °C durante 20 min. **A.** Esquema de los sustratos empleados en B y C: molde/iniciador (M/I), un sustrato *gap* de 5 nucleótidos sin (GAP5OH) y con el grupo fosfato en posición 5' (GAP5P) representado por una esfera. Las reacciones se llevaron a cabo en presencia de 2,5 mM Mg^{2+} , 10 nM, 100 nM y 1000 nM de dNTPs (**B**) y 1 mM Mn^{2+} y 1 nM, 10 nM y 100 nM de dNTPs (**C**). **D.** Fidelidad de la reacción en un GAP5P. Las reacciones se llevaron a cabo como en presencia de 2,5 mM Mg^{2+} y 100 nM de los dNTPs indicados o 1 mM Mn^{2+} y 10 nM de los dNTPs indicados. **E.** Fidelidad de la reacción en un GAP2P. La concentración de Mn^{2+} fue de 1 mM y la de los dNTPs de 100 nM. **F.** Fidelidad de la reacción en un GAP1P. La reacción se llevó a cabo en presencia de 2,5 mM Mg^{2+} y las concentraciones de dNTPs indicadas.

A pesar de ser capaz de polimerizar en diferentes sustratos, la pérdida de la región del *nail* podría alterar su capacidad de contar correctamente las bases del DNA y no llevar a cabo una síntesis fiel. Para dar respuesta a esta hipótesis realizamos un ensayo de fidelidad en sustratos tipo *gap* de diferente número de nucleótidos con grupo 5'P (GAP5P, GAP2P y GAP1P). Los dNTPs complementarios al molde fueron añadidos en orden y por separado. En la situación más compleja, un GAP5P, Polλ(Nailμ) “lee y cuenta” correctamente el DNA molde insertando frente a cada una de las bases el dNTP complementario. Así, rellena el *gap* por completo tanto en presencia de Mg²⁺ como de Mn²⁺ y presenta el mismo patrón de síntesis que Polλ (Figura 34D). Como era de esperar en sustratos más sencillos como el GAP2P o GAP1P, el comportamiento no cambia (Figura 34E y F).

2.4 Capacidad de Polλ(Nailμ) de dislocar la hebra molde

Como hemos comentado anteriormente la región del *nail* parece tener un papel muy importante en regular el proceso de *slipagge* que podría darse sobre secuencias repetidas. En los sustratos anteriormente utilizados no es posible evaluar este desplazamiento. Por ello, realizamos un experimento con un sustrato de DNA tipo *gap* de 3 nucleótidos, donde la primera base del molde (T₁; X) puede ser cada una de las cuatro (dA, dC, dG y dT) y las bases en posición T₂ y T₃ son iguales (dA) (Figura 35A). En este contexto de secuencia, una DNA polimerasa convencional insertaría el nucleótido correcto frente a la primera base del molde (Figura 35A esquema superior). Sin embargo, la polimerasa podría recurrir a un mecanismo de *slipagge* si la base en posición T₁ es igual a la base en posición T₀ (dG; figura 35A esquema del centro). En tercer lugar, puede darse un mecanismo denominado “*de selección de nucleótido*” ya que es éste el que, al aparearse provisionalmente a la posición T₂, provoca que la base en posición T₁ se disloque, quedando fuera de la doble hélice, y ocurriendo la inserción correspondiente a esa dislocación del molde (Figura 35A esquema inferior). Estos sustratos nos permitirían determinar el comportamiento de Polλ(Nailμ) ante distintas situaciones con el mismo contexto de secuencia.

Los dNTPs fueron suministrados de forma individual (ya sea el complementario a la base T₁; X o el complementario a T₂/T₃), o combinando los dos necesarios para completar el relleno del *gap*. Cuando el metal utilizado fue Mg²⁺, Polλ WT apenas fue capaz de deslizar el molde e insertar el nucleótido complementario a T₂ (dTTP; no mostrado). Sin embargo, en presencia de Mn²⁺, Polλ WT fue capaz de insertar no solo el nucleótido complementario a la primera base del molde, sino también dTTP en todos los contextos de secuencia, pero preferentemente cuando la base T₁ fue dG (al igual que la base T₀) (Figura 35B); esto se debe a que Polλ es capaz de deslizar hacia atrás la base molde T₁=G para que aparee con el extremo 3' del iniciador, dejando una base extra-helicoidal, utilizando el mecanismo de *slippage*. La inserción de dTTP en los casos en los que el molde X (T₁) es dC o dT, se

produce por un mecanismo de *selección de nucleótido* en el que dTTP aparea probablemente con la base T₂.

Por su parte, Polλ(Nailμ) fue capaz de incorporar el nucleótido complementario a la base del molde T₁ en todos los contextos de secuencia. Igualmente, Polλ(Nailμ) fue capaz de rellenar completamente el *gap* en presencia de los dNTPs correctos. Sin embargo, solo fue capaz de insertar dTTP cuando el nuevo par formado tras el deslizamiento del molde, es el correcto (dC:dG), es decir, cuando es posible el mecanismo de *slippage* (Figura 35B). Esto sugiere que la eficiencia con la que estabiliza la base extra-helicoidal es mucho menor que la de Polλ WT.

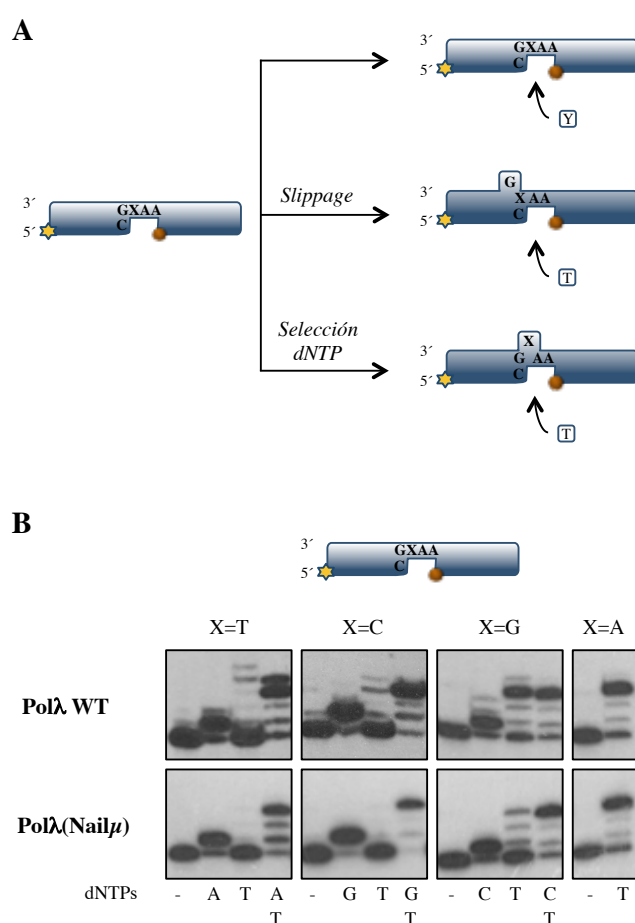


Figura 35. Actividad de Polλ(Nailμ) en sustratos con secuencias repetidas. A. Esquema del sustrato empleado: *gap* de 3 nucleótidos con extremo 5' P. Puede darse la inserción del nucleótido complementario (Y) a la primera base del molde (X) (parte superior) o el deslizamiento del molde dejando una base extra-helicoidal y produciéndose la inserción de dTTP frente a la base dA (parte inferior). **B.** Las reacciones se llevaron a cabo como se describe en Materiales y Métodos durante 20 min, a 30 °C, en presencia de 50 nM de cada DNA polimerasa, 1 mM Mn²⁺ y 100 nM dNTPs.

2.5 Estabilización de la base extra-helicoidal por Polλ(Nailμ)

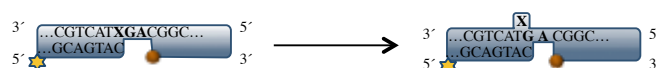
Hemos visto en el apartado anterior que Polλ(Nailμ) no fue capaz de estabilizar una base extra-helicoidal dejando un apareamiento erróneo en el extremo 3' del iniciador y rellenar además el *gap* resultante de 2 nucleótidos. Para poder estudiar mejor la función del dominio *nail* y las consecuencias de haber cambiado el de Polλ por el de Polμ, diseñamos una serie de sustratos más

“fáciles” para Polλ, que nos permitieran responder a preguntas como ¿existe alguna preferencia entre purinas y pirimidinas para la estabilización?, ¿puede producirse la estabilización de dos bases fuera del dúplex de DNA?, ¿a qué distancia del extremo del iniciador debe estar la base extra-helicoidal para que la pérdida del *nail* no sea relevante?. El sustrato de nuevo es un *gap* y no un molde/iniciador abierto, ya que no solo es el preferido por Polλ (Miguel García-Díaz et al., 2002), sino que además nos dará información de lo que puede ocurrir en una situación de reparación de DBS por NHEJ.

Para poder determinar si existe alguna preferencia en cuanto a la base extra-helicoidal llevamos a cabo un ensayo en que los sustratos tienen en posición T₀ cada una de las 4 bases (dA, dC, dG y dT) y en posición T₁ la base complementaria a la del extremo 3' del iniciador para favorecer el deslizamiento del molde o *slippage* (Figura 36A). Al igual que ocurría en *gaps* mayores de un nucleótido, el *nail* es esencial para la estabilización de las bases, aún cuando el sustrato es el más idóneo (Figura 36B). La menor inserción de dTTP cuando X=G, puede ser debida a que en esa situación el par del extremo del iniciador ya es correcto, dG:dCMP, por lo que en ausencia del *nail* es más costoso deslizar el molde para formar el mismo par teniendo además que estabilizar una base extra-helicoidal.

Si suministramos en este caso dCTP, complementario a la base del molde T₀, la inserción fue muy eficaz ya que el extremo del iniciador queda correctamente apareado. Sin embargo, en el resto de sustratos, donde el extremos del iniciador forma pares dC:dC, dA:dC y dT:dC, la inserción de dCTP fue muy poco eficaz (no mostrado), probablemente porque el complejo binario formado presenta la base A como molde tras la dislocación por *slippage*.

A



B

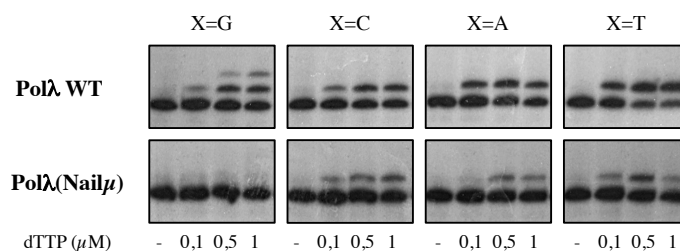


Figura 36. Polλ(Nailμ) estabiliza de igual manera las purinas y las pirimidinas. A. Esquema del sustrato empleado: *gap* de 2 nucleótidos con extremo 5'P cuya secuencia favorece el mecanismo de *slippage*. **B.** Las reacciones se llevaron a cabo como se describe en Materiales y Métodos durante 20 min, a 30 °C, en presencia de 50 nM de cada DNA polimerasa, 2,5 mM Mg²⁺ y las concentraciones de dTTP indicadas.

La **Tabla 4** muestra que no hay una preferencia en cuanto a la base a estabilizar de manera extra-helicoidal, ya que la relación entre la inserción de dTTP de Polλ WT y Polλ(Nailμ) es muy similar cuando X=A, X=C y X=T.

X = G	X = C	X = A	X = T
0,29	0,64	0,66	0,62

Tabla 4. Relación Polλ(Nailμ)/Polλ WT de la inserción de dTTP en cada uno de los sustratos. Los porcentajes de inserción para Polλ WT y Polλ(Nailμ) se han calculado a 0,5 μM dTTP.

Viendo los resultados anteriores es de esperar que Polλ(Nailμ) no pueda estabilizar dos bases extra-helicoidales aún cuando el sustrato lo permita fácilmente. En un sustrato donde la bases molde T_0 y T_1 son iguales y T_2 es complementaria al extremo del iniciador (**Figura 37A**), existen dos posibilidades principalmente: que se produzca la inserción de dGTP frente a dC (extensión de desapareamientos) o la inserción de dTTP por el mecanismo de *slipagge* y la estabilización de dos bases fuera de la hélice de DNA. Polλ WT fue capaz de llevar a cabo los dos procesos (**figura 37B y C**). Sin embargo, Polλ(Nailμ) no fue capaz de extender el desapareamiento inicial dC:dC y requirió mayores concentraciones de dTTP para llevar a cabo el mecanismo de *slipagge*, siendo además una reacción poco eficiente (**figura 37B y C**).

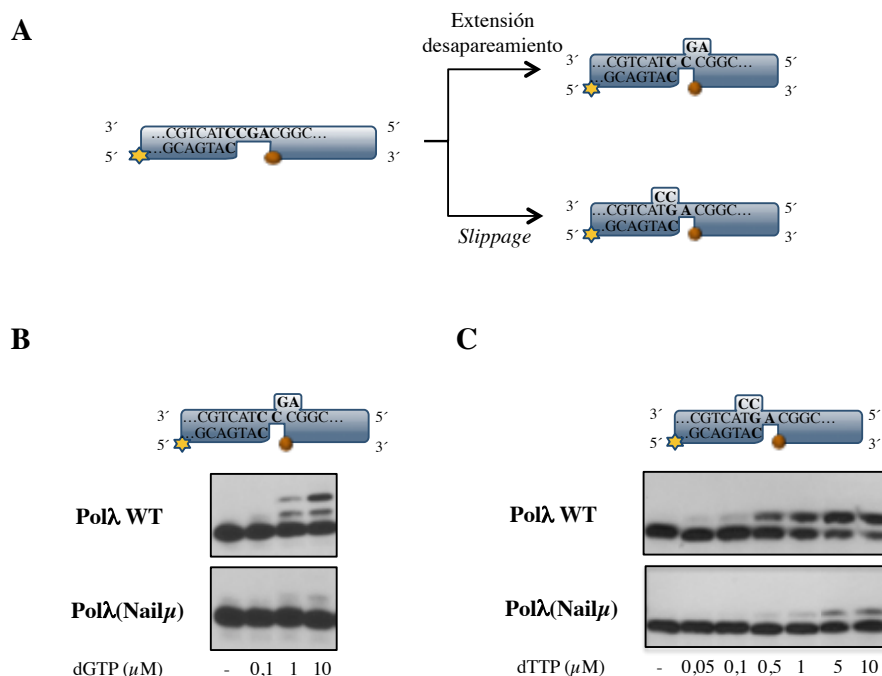


Figura 37. Estabilización de dos bases extra-helicoidales. **A.** Esquema del sustrato empleado: *gap* de 3 nucleótidos con extremo 5'P cuya secuencia favorece el mecanismo de *slipagge*. **B.** Las reacciones se llevaron a cabo como se describe en Materiales y Métodos durante 20 min, a 30 °C, en presencia de 50 nM de cada DNA polimerasa, 2,5 mM Mg^{2+} y las concentraciones de dGTP indicadas. **C.** Las reacciones se llevaron a cabo igual que en B a las concentraciones de dTTP indicadas.

Para poder determinar a qué distancia debe estar la base extra-helicoidal para que la ausencia del *nail* no sea tan relevante utilizamos variantes de los sustratos anteriores en los que la base a estabilizar se va alejando paulatinamente del extremo del iniciador. Observamos que a medida que la distancia entre la base extra-helicoidal y la posición T₁ del molde es mayor, la diferencia entre la actividad de Polλ WT y Polλ(Nailμ) fue disminuyendo.

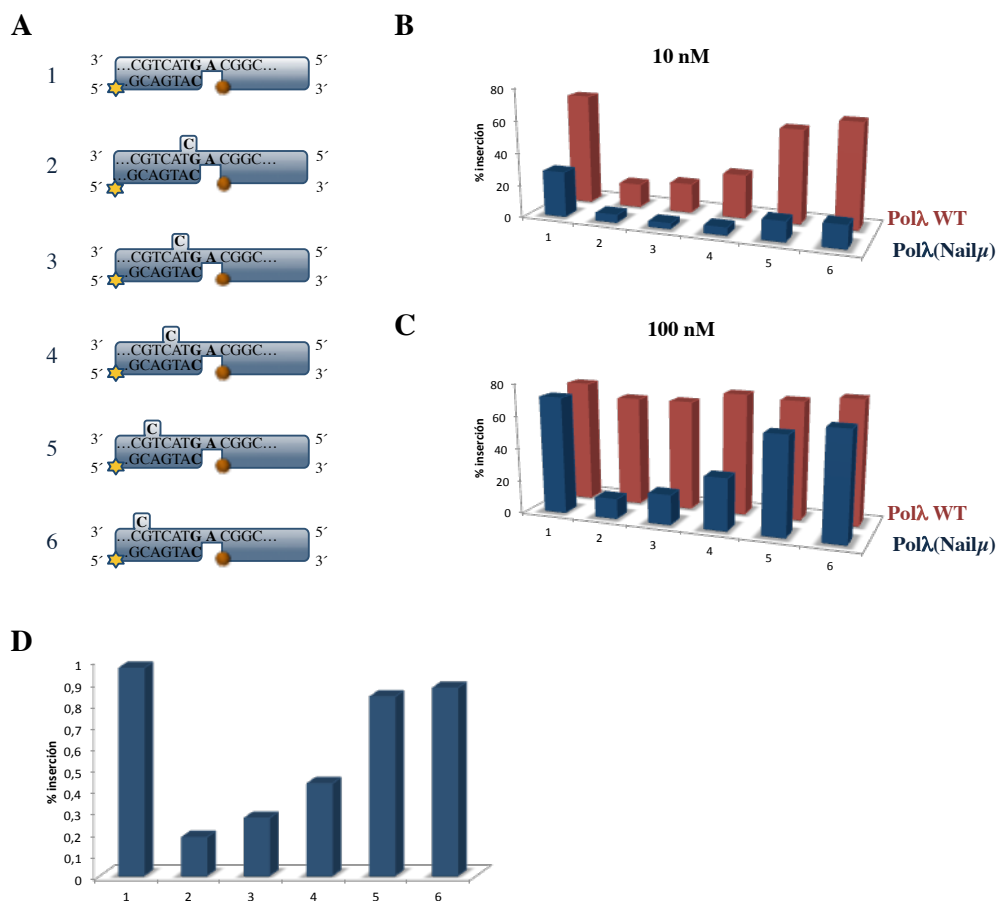


Figura 38. Distancia de la base extra-helicoidal al extremo del iniciador. **A.** Esquema de los sustratos empleados: *gap* de 1 nucleótido con extremo 5'P con la base extra-helicoidal en diferentes posiciones respecto al extremo del iniciador. **B.** Representación gráfica de la inserción de dTTP en los sustratos presentes en A. Las reacciones se llevaron a cabo como se describe en Materiales y Métodos durante 20 min, a 30 °C, en presencia de 50 nM de cada DNA polimerasa, 2,5 mM Mg²⁺ y 10 nM dTTP. **C.** Las reacciones se llevaron a cabo igual que en B a 100 nM dTTP. **D.** Actividad de Polλ(Nailμ) normalizada respecto a la Polλ WT. Las reacciones usadas para la normalización son las llevadas a cabo en C.

Debemos destacar que a bajas concentraciones de dTTP, la estabilización de la base-extra-helicoidal por parte de Polλ WT no fue muy eficiente (**Figura 38B**). Sin embargo, a concentraciones más elevadas de dTTP, Polλ WT apenas acusó la presencia de esta base, siendo su actividad muy similar en cada uno de los sustratos ensayados (**Figura 38C**). Polλ(Nailμ) a 100 nM de dTTP presentó un comportamiento similar al que presenta Polλ WT a una concentración limitante (10 nM) de dTTP (Comparar **figura 38C** barras en azul con **figura 38B** barras en rojo). Este comportamiento nos indica la importancia del dominio *nail*, ya que incluso a concentraciones 10 veces superiores de dTTP, su

ausencia provoca una peor estabilización de la base extra-helicoidal. En estas condiciones la actividad de Polλ(Nailμ) fue respecto a Polλ WT, del 17%, 26% y 42% en sustratos con las bases extra-helicoidales más cercanas al extremo del iniciador (sustratos 2, 3 y 4 respectivamente) (**Figura 38D**).

Los resultados obtenidos indican por tanto, que el dominio *nail* se vuelve más prescindible cuanto mayor es la distancia de la base extra-helicoidal al extremo del iniciador. Las estructuras tridimensionales de Polλ disponibles avalan estos resultados. La base extra-helicoidal queda estabilizada por apilamiento con la región del *nail* y por la interacción de la Lys⁵⁴⁴ con el fosfato en posición 5' respecto a dicha base (Garcia-Diaz et al., 2006). La Arg⁵³⁸ también interacciona con la zona del molde. Realizando un modelado de la quimera Polλ(Nailμ) (<http://swissmodel.expasy.org/>) observamos, como era esperable, que las interacciones de los residuos Arg⁵³⁸ y Lys⁵⁴⁴ se pierden en Polλ(Nailμ) (**Figura 39**) por lo que la estabilización de la base extra-helicoidal no puede darse. El resto de interacciones con la zona molde se mantiene en la proteína quimérica. A medida que la base se desplace hacia la zona del iniciador, la región del *nail* deja de ser la encargada de su estabilización. Es probable que en esta región la base que quede fuera del dúplex de DNA establezca interacciones con la región del Loop 1 de Polλ.

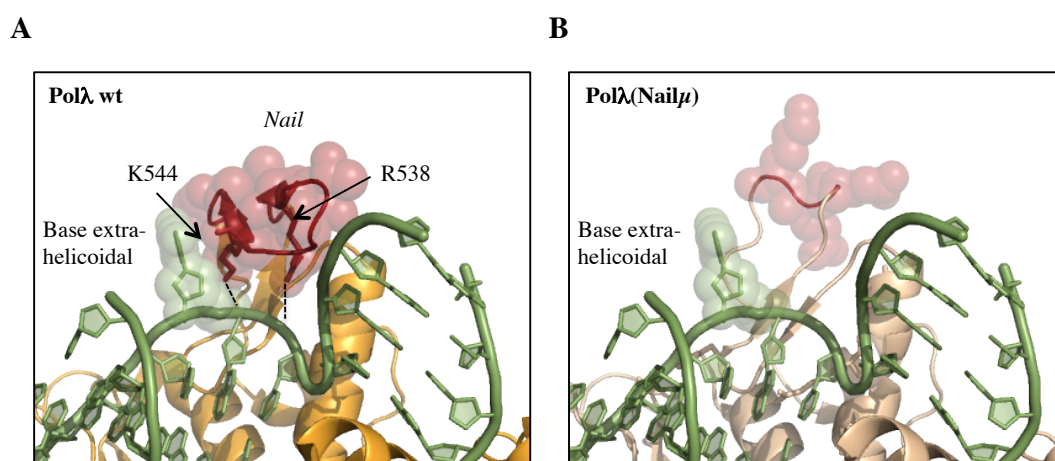


Figura 39. Estabilización de la base extra-helicoidal por el *nail* de Polλ. **A.** Interacciones de los residuos R538 y K544 del *nail* de Polλ con la zona molde (PDB id 1XSN). Se muestra la superficie de la región del *nail* y de la base extra-helicoidal, observándose el apilamiento de ambas. **B.** Modelado de la proteína quimérica Polλ(Nailμ). Se muestra la superficie de la región del *nail* y la base extra-helicoidal. La región del *nail* en Polλ(Nailμ) es mucho más pequeña cambiando además su orientación.

2.6 Efecto del metal sobre la actividad de Polλ(Nailμ)

Basándonos en su abundancia celular, se ha establecido que el Mg²⁺ es el metal divalente más utilizado por las DNA polimerasas. Sin embargo, en los últimos años han aumentado el número de estudios que han determinado la capacidad de las polimerasas de utilizar otros metales como Mn²⁺, Co²⁺, Ni²⁺ o Zn²⁺. El Mn²⁺ disminuye la fidelidad de síntesis en las Familia A y B, pero también favorece la síntesis a través de lesiones de algunas polimerasas. El efecto de sustituir los iones Mg²⁺

por Mn^{2+} , también se ha estudiado en la Familia X. Así, Pol β disminuye hasta 30 veces su K_m en presencia de Mn^{2+} (Wang et al., 1977). Los análisis de Pol λ sobre la utilización del Mn^{2+} , revelan que puede ser el metal utilizado al ser Pol λ activa en un rango amplio de Mn^{2+} mientras que concentraciones elevadas de Mg^{2+} inhiben la actividad de esta polimerasa (Blanca et al., 2003; Maga et al., 2006). Se ha propuesto que Pol λ puede unirse con mayor afinidad a los iones Mn^{2+} que a los iones Mg^{2+} y por tanto podría estar adaptada para utilizar iones Mn^{2+} *in vivo* (Blanca et al., 2003). Análisis estructurales confirman la presencia de estos cationes divalentes en el centro activo del enzima (Garcia-Diaz et al., 2007). En el caso de Pol μ , los iones Mn^{2+} favorecen la eficiencia de las reacciones de NHEJ de mínima complementariedad, e incluso mejoran su fidelidad cuando estos iones se combinan con el uso de ribonucleótidos como sustratos (Martin et al., 2012).

Como hemos visto anteriormente en presencia de iones Mg^{2+} en sustratos tipo molde/iniciador y GAP5OH, Pol λ (Nail μ) presentó una actividad ligeramente inferior a Pol λ (**Figura 34B**), al igual que ocurría a bajas concentraciones de dTTP en un GAP1P (**Figura 38D**). Quisimos por tanto estudiar más en profundidad estas diferencias de comportamiento en función del metal presente en la reacción. Para ello, medimos la capacidad de inserción del nucleótido correcto en presencia de Mg^{2+} y Mn^{2+} en moléculas tipo molde/iniciador, GAP1OH y GAP1P. Como se observa en las gráficas de la **figura 40**, a bajas concentraciones de nucleótido la diferencia entre la actividad de Pol λ y Pol λ (Nail μ) fue más acusada en presencia de iones Mg^{2+} que de iones Mn^{2+} . De hecho cuando el sustrato es el óptimo para la polimerasa (GAP1P) apenas hubo diferencia entre Pol λ y la proteína quimérica cuando el metal utilizado en la reacción fue Mn^{2+} . Para determinar si el efecto del Mn^{2+} se mantiene a diferentes concentraciones del metal, bajamos la concentración del mismo a 100 μM y 50 μM . De nuevo la actividad de Pol λ y Pol λ (Nail μ) fue en paralelo a 100 μM de Mn^{2+} (**Figura 40D**) y ninguna de las polimerasas presentó polimerización a concentraciones más bajas del metal (no mostrado).

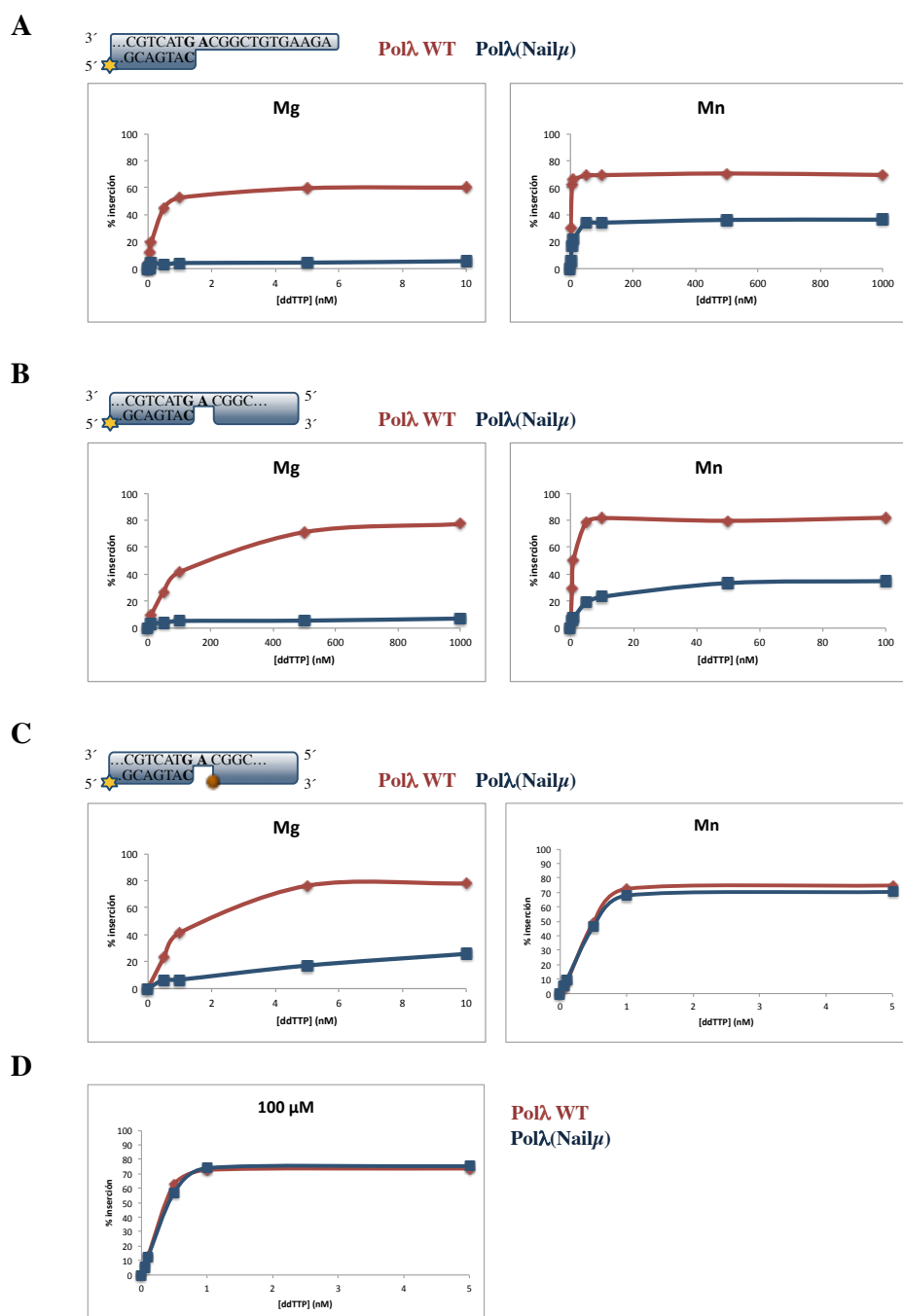


Figura 40. Actividad de Polλ y Polλ(Nailμ) en función del sustrato de DNA y del metal presente en la reacción. Las reacciones se llevaron a cabo como describe en Materiales y Métodos a 30 °C durante 20 min siendo el sustrato un molde/iniciador (A), un GAP1OH (B) o un GAP1P (C), en presencia de las concentraciones de ddTTP indicadas en cada caso, 2,5 mM Mg²⁺ o 1 mM Mn²⁺ y 50 nM DNA polimerasa en todos los casos excepto en C en presencia de Mn²⁺ que es 25 nM. D. La reacción se llevó a cabo usando el mismo sustrato que en C, en presencia de 100 μM Mn²⁺, 25 nM DNA polimerasa y las concentraciones de ddTTP indicadas.

Para estudiar el efecto del metal sobre la actividad de Polλ(Nailμ) en la estabilización de bases extra-helicoidales utilizamos los mismos sustratos que anteriormente, donde la posición de la base extra se aleja paulatinamente del centro activo del enzima. Observamos que incluso en presencia de Mn²⁺ la estabilización de la base extra-helicoidal se vio afectada por la ausencia de la región del *nail*.

A pesar de ser más eficiente la reacción que en presencia de iones Mg^{2+} , Pol λ (Nail μ) presentó un porcentaje de inserción de ddTTP del 66% y 77% en sustratos donde la base extra-helicoidal está más cerca del extremo 3' del iniciador (sustratos 2 y 3 respectivamente) (**Figura 41**). Por tanto podemos afirmar que independientemente del metal utilizado en la reacción, la región del *nail* de Pol λ es fundamental para estabilizar bases extra-helicoidales en el DNA siendo más prescindible a medida que dicha base se aleja del extremo del iniciador.

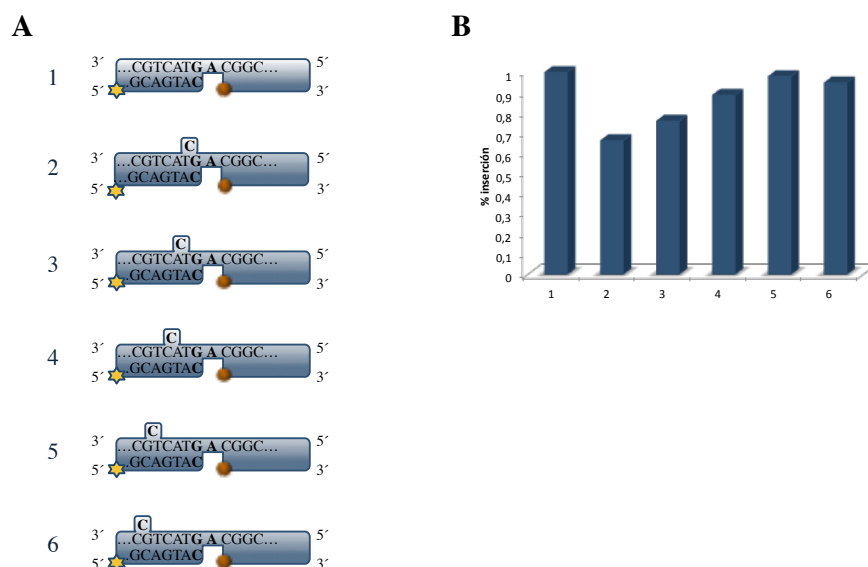


Figura 41. Efecto del Mn^{2+} sobre la distancia de la base extra-helicoidal al extremo del iniciador. A. Esquema de los sustratos empleados: *gap* de 1 nucleótido con extremo 5'P con la base extra-helicoidal en diferentes posiciones respecto al extremo del iniciador. B. Actividad de Pol λ (Nail μ) normalizada respecto a la Pol λ WT. Las reacciones se llevaron a cabo como se describe en Materiales y Métodos durante 20 min, a 30 °C, en presencia de 50 nM de cada DNA polimerasa, 1 mM Mn^{2+} y 0,5 nM ddTTP.

2.7 Extensión de apareamientos erróneos mediada por Pol λ (Nail μ)

Anteriormente hemos visto como Pol λ (Nail μ) no fue capaz de extender apareamientos erróneos cuando el sustrato contiene un *gap* de 3 nucleótidos (**Figura 37B**). Nos preguntamos si en una situación más sencilla, en la que el *gap* fuese de un único nucleótido con extremo 5'P, Pol λ (Nail μ) extiende pares erróneos tan eficazmente como Pol λ WT. De los apareamientos erróneos estudiados, el par incorrecto dA:dG apenas resultó extendido (**Figura 42**). Sin embargo, los pares dG:dG y dT:dG sí que fueron extendidos por Pol λ (Nail μ) aunque con baja eficiencia en relación a Pol λ WT.

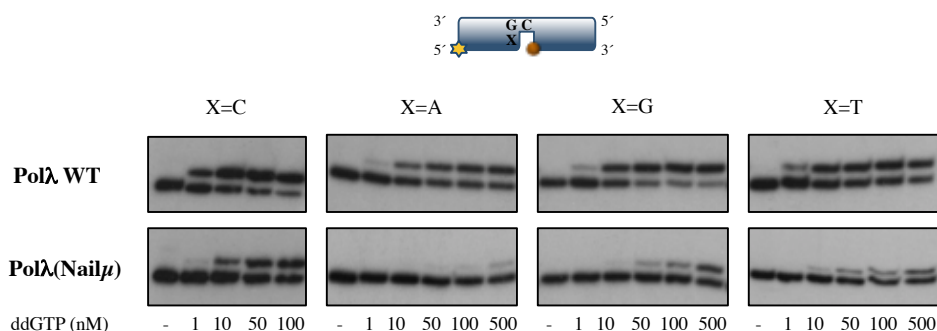


Figura 42. Extensión de apareamientos erróneos. Las reacciones se llevaron a cabo como se describe en Materiales y Métodos durante 20 min, a 30 °C, en presencia de 50 nM de cada DNA polimerasa, 2,5 mM Mg^{2+} y las concentraciones de ddGTP indicadas.

Cuando Polλ extiende desapareamientos su estructura global no se ve afectada. En complejo con un DNA cuyo extremo del iniciador está formado por un par dG:dG, apenas se observan cambios en las cadenas laterales de la proteína, y en la estructura del DNA (Figura 43), lo que significa que Polλ es capaz de acomodarlo fácilmente en su centro activo (Picher et al., 2006). Es posible que Polλ(Nailμ) si que vea alterada su estructura del centro activo, por lo que le es más difícil acomodar estos apareamientos erróneos para su posterior extensión.

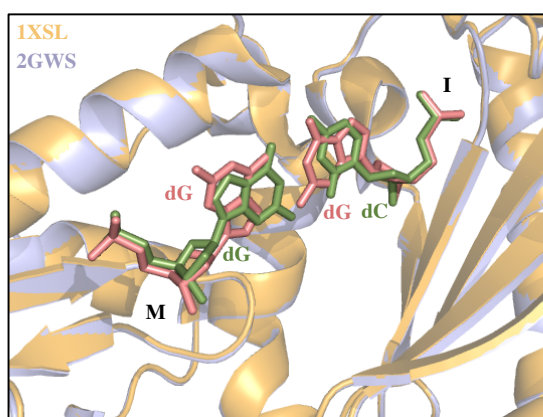


Figura 43. Estructura de Polλ en complejo binario con un apareamiento erróneo en el extremo del iniciador. Se superponen la estructura de Polλ en complejo binario (PDB id 1XSL, naranja) con un par correcto dG:dC y en complejo binario con un par incorrecto dG:dG en el extremo del iniciador (PDB id 2GWS, azul). El par correcto dG:dC se muestra en verde y el incorrecto dG:dG en rosa. M: molde. I: iniciador.

2.8 Influencia de la región del *nail* en NHEJ

Para poder estudiar la relevancia de la pérdida de la región del *nail* en la reparación de DSBs mediante NHEJ, analizamos la actividad de Polλ(Nailμ) en extremos de DNA con complementariedades de 3 y 4 pb. Quisimos a la vez evaluar la influencia del metal presente en la reacción. Así, observamos que la actividad de Polλ(Nailμ) se vio fuertemente disminuida cuando la unión de los extremos es de 3 pb, independientemente de si el metal presente en la reacción es Mg^{2+} o

Mn^{2+} (**Figura 44A**). Además, en presencia de Mg^{2+} esta actividad fue indetectable. Al aumentar la conexión a 4 pb se produjo un incremento en la eficiencia de la reacción por parte de Pol λ (Nail μ) en presencia de ambos iones. Sin embargo, cabe destacar que esta eficiencia dista de la de Pol λ WT, ya que fue necesario aumentar la dosis de ddGTP para observar una incorporación comparable en ambas polimerasas (**Figura 44B**). Por tanto, el intercambio de la región del *nail* de Pol λ por el de Pol μ afecta también a la eficiencia de la reparación por NHEJ especialmente en un contexto de 3 pb, sub-óptimo para Pol λ .

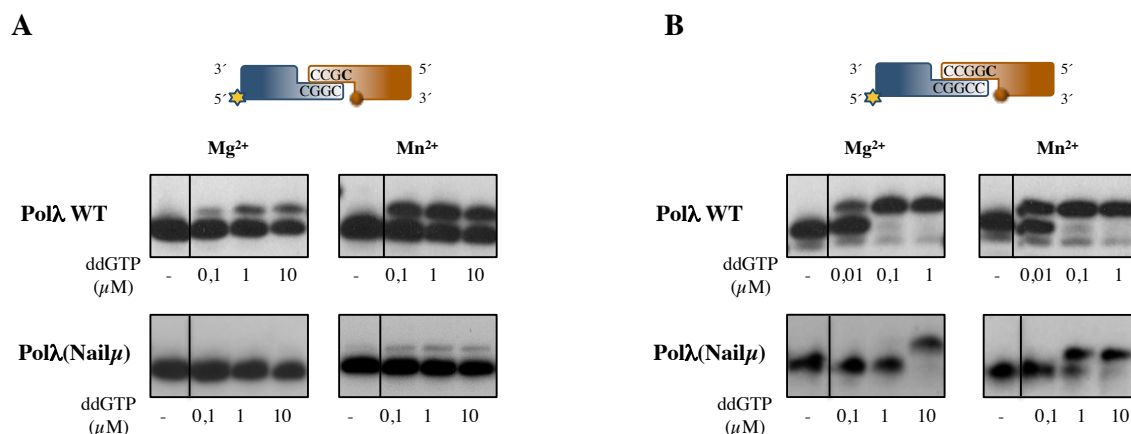


Figura 44. Actividad de Pol λ (Nail μ) en NHEJ. Las reacciones se llevaron a cabo como se describe en Materiales y Métodos. El sustrato marcado (azul) está formado por hibridación del oligonucleótido D3 y D3+C (**A** y **B** respectivamente) con D1 y el sustrato no marcado (naranja) por hibridación de D4-C y D4-GC (**A** y **B** respectivamente) con D2. La esfera naranja indica la presencia del grupo 5'P en la cadena *downstream* del sustrato. Las reacciones se incubaron durante 60 min a 30 °C, en presencia de 2,5 mM Mg^{2+} o 0,1 mM Mn^{2+} , 500 nM DNA polimerasa y las concentraciones de ddGTP indicadas en cada caso.

3

El Loop 1 de Pol λ y la complementariedad de bases durante la reparación por NHEJ

3.1 Polλ presenta un Loop 1 en su dominio *palma*

Al analizar las estructuras cristalográficas de las polimerasas de la Familia X, podemos observar que no solo difieren en la región del *nail* estudiada en el capítulo anterior, sino que existe otro *loop* característico en el dominio *palma*, entre las láminas β 7 y 8. Identificado como Loop 1, fue descrito por primera vez en TdT (Delarue et al., 2002). Al igual que ocurre con la región del *nail*, el Loop 1 varía de unas polimerasas a otras dentro de la Familia X. TdT y Polμ presentan un Loop 1 de aproximadamente 20 aminoácidos. En TdT es un dominio fijo, observable en la estructura cristalográfica, que juega un papel determinante en su actividad transferasa terminal (**Figura 45**). En Polμ el Loop 1 se caracteriza por ser una región móvil que no ha podido ser cristalizada (Moon, Garcia-Diaz, Bebenek, et al., 2007). Al ser Polμ una polimerasa dependiente de molde, con actividad transferasa terminal, el Loop 1 puede adquirir una conformación “abierta” cuando la síntesis es dependiente de molde o una conformación “cerrada” actuando de pseudo-molde cuando realiza una síntesis independiente del mismo. La eliminación del Loop 1 en Polμ compromete su actividad transferasa terminal (Juárez et al., 2006) y de NHEJ de extremos no complementarios (Nick McElhinny et al., 2005). El intercambio de Loop 1 de Polμ por el de TdT tiene como consecuencia una proteína quimérica cuyas propiedades bioquímicas son intermedias entre ambas polimerasas, ya que presenta actividad transferasa terminal pero con un patrón diferente al de Polμ (Juárez et al., 2006). El Loop 1 está ausente en Polβ, presentándose como un “giro” formado únicamente por 3 residuos entre sus láminas β 3 y 4. (Bebenek et al., 2010) (**Figura 45**).

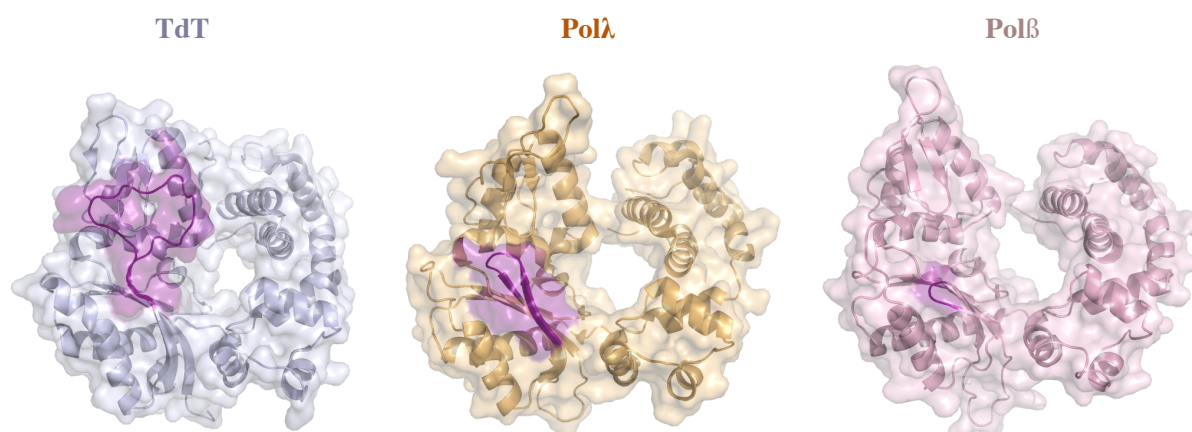


Figura 45. Comparación del Loop 1 de la Familia X. Estructura en *cartoon* y en superficie de TdT (PDB id 1JMS), Polλ (PDB id 1XSL) y Polβ (PDB id 1BPX). Se destaca en morado el Loop 1 en cada una de las proteínas, observándose la diferencia de tamaño entre TdT y Polλ y siendo casi inexistente en Polβ.

Por último, Polλ posee un Loop 1 más pequeño que Polμ y TdT, de unos 10 aminoácidos, implicado directamente en la fidelidad de la polimerasa (Bebenek et al., 2010) (**Figura 45**). Cuando el Loop 1 de Polλ es sustituido por la misma región de Polβ, su actividad de polimerización, así como su procesividad aumentan. Sin embargo, también se ve incrementada su tasa de error de sustitución de

bases y de inserciones y deleciones y su actividad de reparación por NHEJ. La estructura de Polλ en complejo binario y ternario muestra el cambio conformacional que sufre el Loop 1, pasando de situarse hacia “dentro” (sobre el DNA) a abrirse hacia “fuera”, permitiendo el cambio de posición del DNA con la llegada del nucleótido entrante.

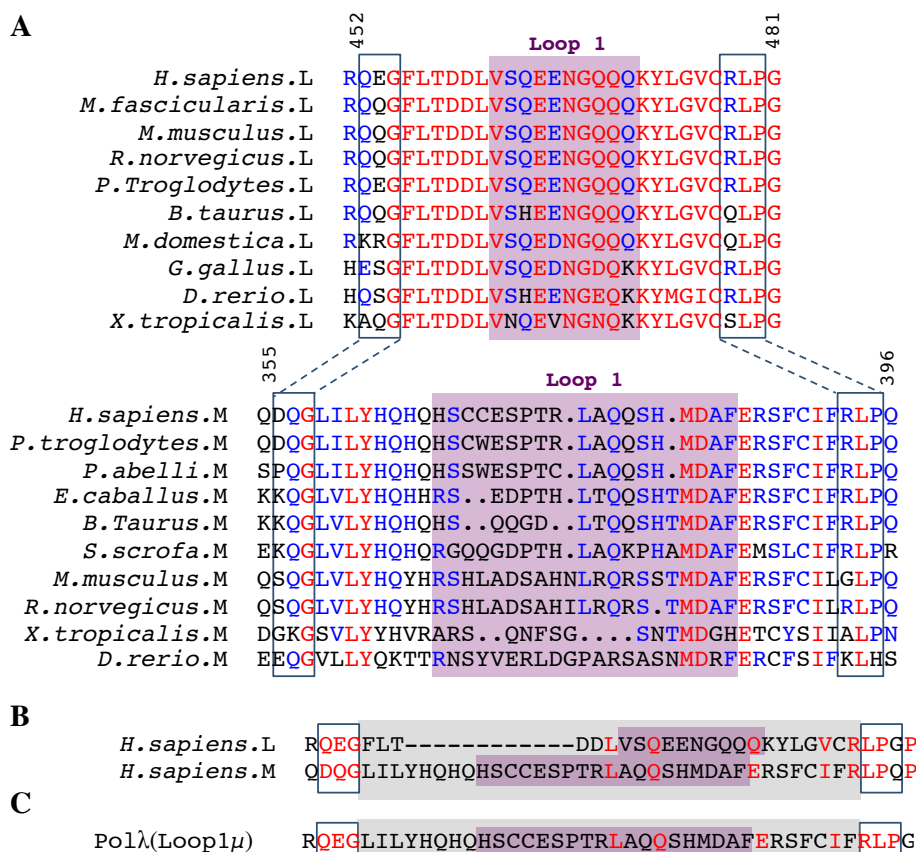


Figura 46. Análisis de secuencia del Loop 1 de Polλ y Polμ. **A.** Comparación de secuencias de diferentes especies de la región del Loop1 de Polλ (arriba) y de Polμ (abajo). Es un dominio conservado evolutivamente. El recuadro con fondo malva indica la secuencia estricta del Loop 1 en ambas polimerasas. En la parte superior se indica el número de residuos respecto a las secuencias de Polλ y Polμ en humanos. **B.** Alineamiento del Loop 1 de Polλ y Polμ humanas. El recuadro con fondo malva indica la secuencia estricta del Loop 1 en ambas polimerasas, mientras que el recuadro con fondo gris indica la región intercambiada. **C.** Secuencia del Loop 1 de la proteína quimérica obtenida Polλ(Loop1μ). El recuadro con fondo malva indica la secuencia estricta del Loop 1 de Polμ, mientras que el recuadro con fondo gris indica la región intercambiada.

La relevancia del Loop 1 en la función de las polimerasas que lo poseen, así como su alto grado de conservación y el gradiente de dependencia de molde de Polλ, Polμ y TdT, nos llevó a preguntarnos si esta región podía ser intercambiada entre Polλ y Polμ. La región del Loop 1 en Polλ está formada por 10 aminoácidos (Val⁴⁶²-Gln⁴⁷¹) y en Polμ por 17 aminoácidos (His³⁶⁷-Phe⁴⁸⁵). Sin embargo, con el objetivo realizar un cambio aún más conservativo, que no produzca alteraciones estructurales en el dominio *palma*, hemos ampliado la zona de intercambio como se muestra en la **figura 46**. Así, obtenemos una proteína quimérica (Polλ(Loop1μ)) en la que un total de 22 aminoácidos de Polλ han sido sustituidos por 34 de Polμ. Debido a que aquella polimerasa de la

Familia X que posee Loop 1 no posee la región del *nail* y viceversa, y con el objetivo de completar el estudio sobre la función de ambas regiones, hemos obtenido una tercer proteína quimérica denominada Polλ(Loop1μ+Nailμ). En esta proteína se han intercambiado ambas regiones de Polλ por las correspondientes de Polμ.

3.2 Capacidad de unión de Polλ(Loop 1μ) y Polλ(Loop 1μ+Nailμ) al DNA

La obtención de las proteínas quiméricas Polλ(Loop1μ) y Polλ(Loop1μ+Nailμ) se llevó a cabo como se describe en Materiales y Métodos. Al contrario de lo que ocurrió con la quimera Polλ(Nailμ), estas dos proteínas quiméricas no pudieron ser expresadas a la temperatura habitual por problemas de solubilidad. Con el fin de enriquecer la fracción soluble con la proteína de interés, la expresión se realizó a 18 °C, a una concentración de 0,5 mM de IPTG. La posterior purificación se llevó a cabo como se describe en Materiales y Métodos.

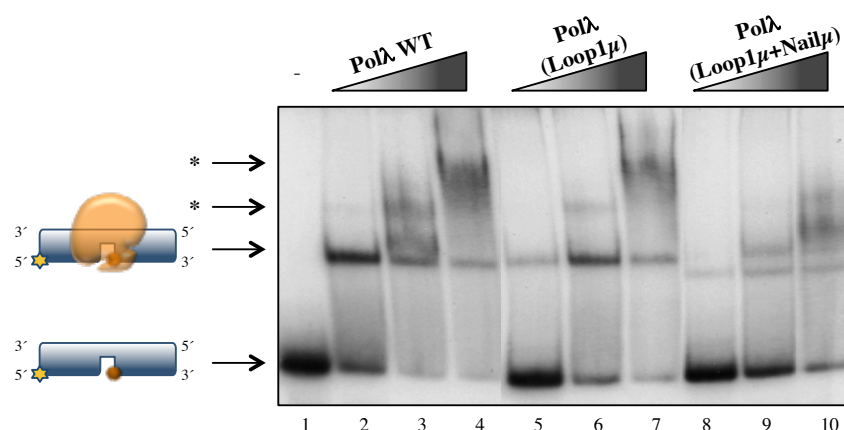


Figura 47. Polλ(Loop1μ) y Polλ(Loop1μ+Nailμ) presentan una unión estable en un GAP1P. La reacción se llevó a cabo como se describe en Materiales y Métodos empleando el sustrato indicado, a 30 °C durante 15 min. Las dosis de las diferentes DNA polimerasas fueron: 300 nM, 600 nM y 1,2 μM. Tras la electroforesis a 4 °C, los geles se secaron y se revelaron por autorradiografía.

Tras obtener ambas proteínas purificadas, quisimos determinar el efecto que podría tener para la unión de Polλ al DNA la presencia de un Loop 1 más grande de lo habitual. En un ensayo de retardo en gel con un sustrato de DNA tipo GAP1P observamos que se forman complejos estables E:DNA tanto en el caso de Polλ(Loop1μ) como Polλ(Loop1μ+Nailμ). Sin embargo, los complejos no fueron iguales en ambos casos. Polλ(Loop1μ) presentó un comportamiento comparable a Polλ WT, a pesar de que a igual concentración de proteína, la afinidad por el DNA no fue la misma, quedando más DNA libre en los carriles correspondientes a Polλ(Loop1μ) (Figura 47, comparar carriles 2, 3 y 4 con 5, 6 y 7). Por su parte, Polλ(Loop1μ+Nailμ) fue capaz de formar complejos estables E:DNA pero su afinidad por el DNA difiere de la de Polλ WT (Figura 47, comparar carriles 2 y 3 con 8 y 9). La formación de

súper-complejos marcados con * también se vio alterada; Polλ(Loop1μ+Nailμ) formó complejos con el DNA que presentaron una movilidad mayor que los formados por Polλ WT.

3.3 La presencia de un Loop 1 grande y móvil altera la actividad de síntesis de DNA de Polλ

La presencia del Loop 1 puede no solo conllevar cambios en el patrón de unión de Polλ al DNA, sino variar la capacidad de polimerización de Polλ en diferentes tipos de sustratos. Para comprobar si Polλ(Loop1μ) y Polλ(Loop1μ+Nailμ) son activas y el tipo de síntesis que llevan a cabo, realizamos un ensayo en sustratos de DNA tipo molde/iniciador, GAP5OH y GAP5P. La capacidad de polimerización de ambas quimeras se vio fuertemente alterada en los dos primeros sustratos ensayados, tanto en presencia de Mg²⁺ como de Mn²⁺ (**Figura 48B y C**). La presencia del grupo 5'P estimuló la polimerización en ambas proteínas. Sin embargo, el relleno completo del *gap* solo tuvo lugar en presencia de Mn²⁺ con una eficiencia menor que Polλ WT. La proteína quimérica Polλ(Loop1μ+Nailμ) presentó una alteración mayor de su actividad. Al analizar la actividad de ambas proteínas en un sustrato GAP1P, observamos que aún siendo menos eficiente que Polλ WT, la polimerización de Polλ(Loop1μ) se vio favorecida (**Figura 48D** gráfica izquierda). Sin embargo, la actividad de Polλ(Loop1μ+Nailμ) dista mucho de Polλ WT, requiriéndose una concentración mucho mayor de nucleótido (**Figura 48D** gráfica derecha). Cuando en este mismo tipo de sustrato de DNA analizamos la fidelidad de ambas proteínas quiméricas observamos que salvando la necesidad de una concentración mayor de ddNTPs, la inserción en todos los casos estuvo dirigida por la base molde (**Figura 48E**).

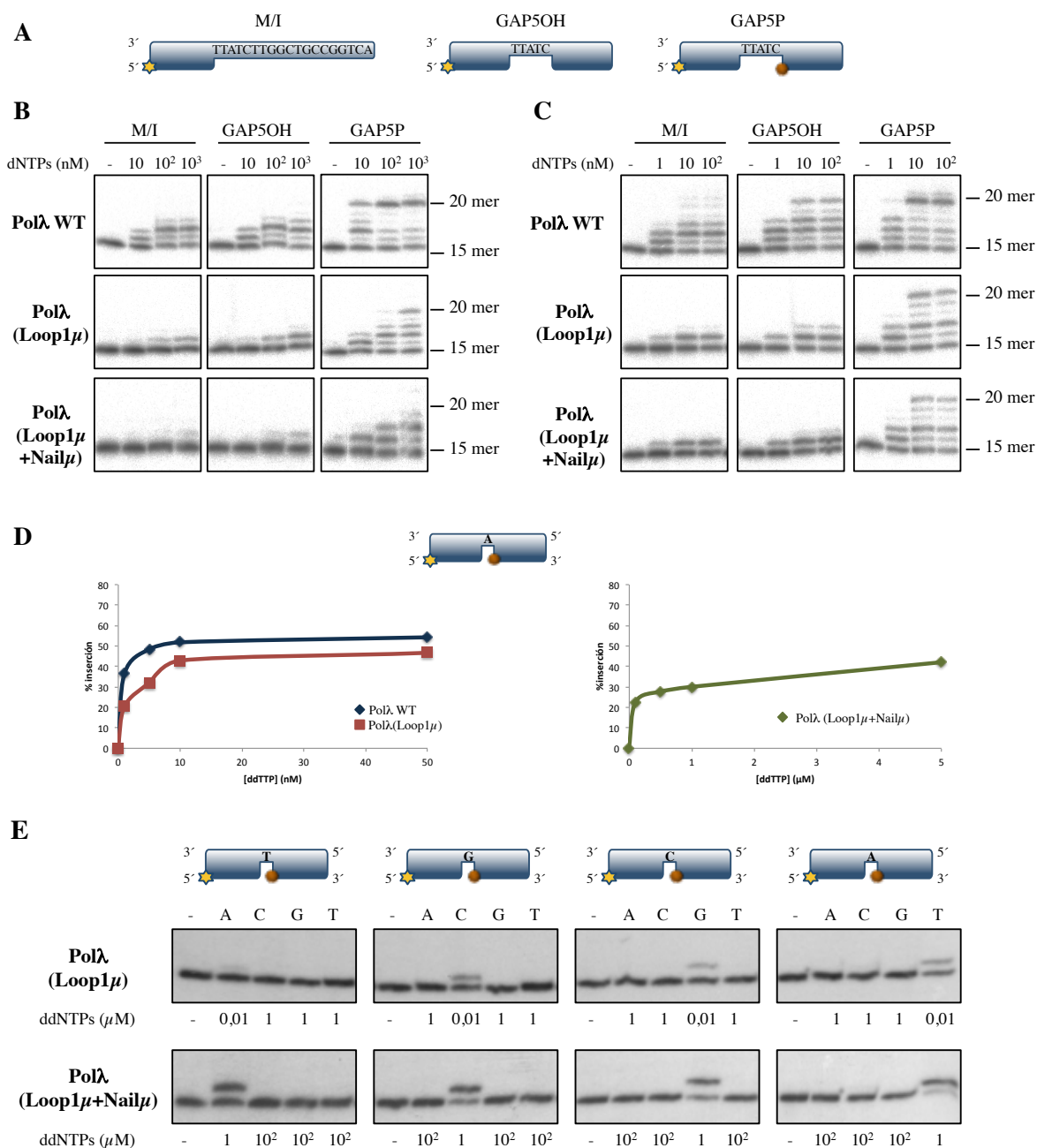


Figura 48. Actividad de Polλ(Loop1μ) y Polλ(Loop1μ+Nailμ) en diferentes sustratos. **A.** Los distintos sustratos empleados en B y C fueron un molde/iniciador (M/I), un sustrato *gap* de 5 nucleótidos sin el grupo fosfato en posición 5' (GAP5OH) y un sustrato *gap* de 5 nucleótidos con un grupo fosfato en posición 5' (GAP5P) representado por una esfera. Las reacciones se llevaron a cabo como se describe en Materiales y Métodos en presencia de 2,5 mM Mg²⁺, 10 nM, 100 nM y 1000 nM dNTPs (**B**) y 1 mM Mn²⁺ y 1 nM, 10 nM y 100 nM dNTPs (**C**). En ambos casos las reacciones se incubaron a 30 °C durante 20 min y a una concentración de DNA polimerasa de 50 nM. **D.** El sustrato empleado, GAP1P se muestra en la parte superior. Las reacciones se llevaron a cabo como se describe en Materiales y Métodos en presencia de 2,5 mM Mg²⁺, 1 nM, 5 nM, 10 nM y 50 nM en el caso de Polλ WT y Polλ(Loop1μ) y 100 nM, 500nM, 1 μM y 5 μM en el caso de Polλ(Loop1μ+Nailμ). **E.** Fidelidad de la reacción en un GAP1P. La reacción se llevó a cabo durante 20 min a 30 °C, en presencia de 50 nM de cada DNA polimerasa y 2,5 mM Mg²⁺ y las concentraciones de dNTPs indicadas en cada caso.

3.4 La presencia del Loop 1 en Polλ no favorece su actividad transferasa terminal

La ausencia del Loop 1 en Polμ compromete seriamente la actividad transferasa terminal de esta polimerasa (Juárez et al., 2006). Gracias al Loop 1 Polμ es capaz de alternar la síntesis dirigida por molde y la síntesis no dependiente del mismo. Hemos visto en el apartado anterior que tanto Polλ(Loop1μ) como Polλ(Loop1μ+Nailμ) son activas y capaces de polimerizar de forma dependiente de molde. Nos preguntamos si la presencia del Loop 1 de Polμ dotaba a Polλ de la capacidad de polimerizar en un sustrato de DNA de banda simple. En un sustrato de DNA de banda simple heteropolimérico puede ocurrir que se formen estructuras secundarias por complementariedad interna del mismo. Para evitarlo y asegurarnos de que la polimerización es independiente de molde utilizamos un DNA de banda simple homopolimérico (PolydA). Polμ fue capaz de insertar cada uno de los cuatro dNTPs con diferente afinidad y eficiencia (Figura 49). Sin embargo, Polλ WT no llevó a cabo la adición de ningún dNTP sobre un DNA de banda simple. Por su parte, las proteínas quiméricas Polλ(Loop1μ) y Polλ(Loop1μ+Nailμ) tampoco presentaron actividad transferasa terminal a pesar de poseer el Loop 1 de Polμ que podría haber actuado de pseudo-molde.

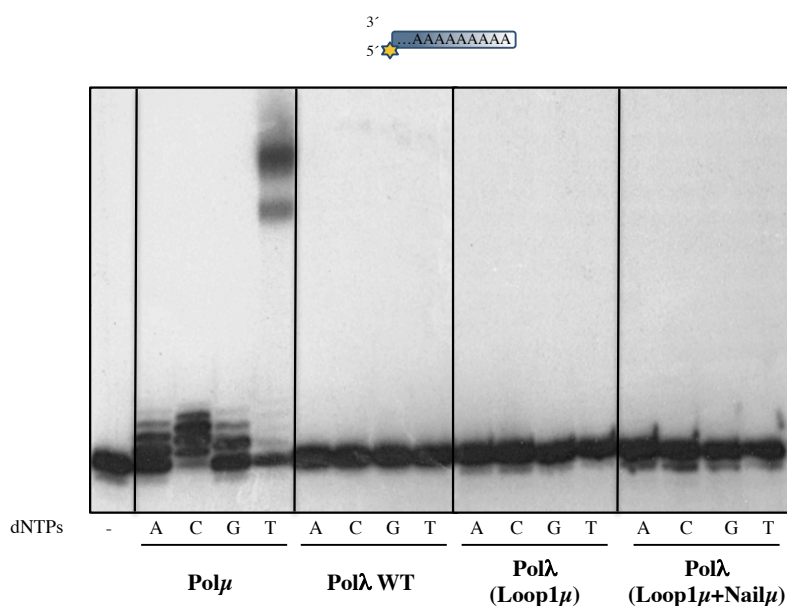


Figura 49. Actividad transferasa terminal de Polλ(Loop1μ) y Polλ(Loop1μ+Nailμ). El sustrato utilizado en la reacción se muestra en la parte superior izquierda. Las reacciones se llevaron a cabo a 30 °C durante 1h, en presencia de 1 mM Mn²⁺, 100 μM dNTPs y 600 nM de cada una de las DNA polimerasas.

El análisis de la actividad transferasa terminal de una quimera de Polμ en la que su Loop 1 ha sido intercambiado por el de TdT, muestra que a pesar de que dicha actividad no se pierde, si se ve alterada, presentando un comportamiento intermedio entre las actividades de Polμ y TdT (Juárez et al., 2006). Estos resultados junto a los obtenidos con Polλ(Loop1μ) y Polλ(Loop1μ+Nailμ) demuestran que siendo el Loop 1 fundamental para la capacidad de polimerizar de forma independiente de molde,

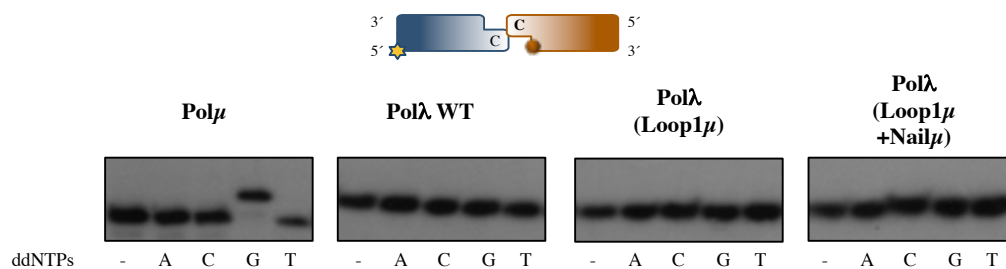
su presencia no implica la adquisición de esta capacidad, si no que el centro activo de la polimerasa requiere elementos adicionales para dicha función.

3.5 Actividad de Polλ(Loop1μ) y Polλ(Loop1μ+Nailμ) en NHEJ

La eliminación del Loop 1 en Polμ no solo compromete su actividad transferasa terminal si no que además estudios previos realizados en nuestro laboratorio por la Dra. María José Martín, han demostrado que Polμ-ΔLoop1 posee alterada su capacidad de reparación de DSBs mediante NHEJ, resultados que son congruentes con otros publicados en presencia de factores accesorios de NHEJ (Nick McElhinny et al., 2005). La pérdida del Loop 1 en Polμ hace que la actividad de NHEJ solo tenga lugar en presencia de iones Mn^{2+} , provocando además un cambio en la preferencia de sustratos de DNA. Polμ-ΔLoop1 prefiere sustratos donde los extremos protuberantes de DNA son complementarios en 2 ó 3 pares de bases. Esto pone de manifiesto la importancia del Loop 1 en la reunión de extremos con protuberancias pequeñas e incompatibles. Como hemos visto en el capítulo 1, Polλ posee la capacidad intrínseca de llevar a cabo la reunión de dos extremos de DNA 3' protuberantes siempre que éstos presenten cierta complementariedad de bases, aumentando la eficiencia de la reacción con el número de bases apareados. ¿Favorece la presencia del Loop 1 de Polμ la reparación por NHEJ de Polλ cuando los extremos no son compatibles? Para responder a esta pregunta llevamos a cabo un ensayo donde los sustratos de DNA dejan extremos no compatibles, con una sola base protuberante. Con el objetivo de favorecer la reacción el metal utilizado fue Mn^{2+} . La actividad tanto de Polλ(Loop1μ) como de Polλ(Loop1μ+Nailμ) fue indetectable en este tipo de protuberancia al igual que ocurre con Polλ (**Figura 50A**). Como en el caso de la actividad transferasa terminal, la capacidad de completar reacciones de NHEJ con extremos incompatibles se ve favorecida en Polμ por la presencia del Loop 1. Sin embargo, a la vista de los resultados obtenidos, debemos concluir que el Loop1 no debe ser el único elemento implicado en dicha función. Por tanto, la diferencia y especificidad de sustratos entre Polλ y Polμ en NHEJ no reside exclusivamente en elementos estructurales como el Loop 1.

En cuanto a la capacidad de estas proteínas quiméricas de reparar roturas con complementariedad de bases en la conexión, observamos que tanto en conexiones con 3 pb como con 4 pb, Polλ(Loop1μ) y Polλ(Loop1μ+Nailμ) presentaron un actividad mucho menor que Polλ (**Figura 50B**). En el caso de Polλ(Loop1μ+Nailμ) pudimos observar cierta actividad cuando la conexión es de 3 pb pero al aumentar a 4 las bases apareadas, la actividad de ambas proteínas quiméricas es prácticamente indetectable (**Figura 50B izquierda**). Este comportamiento puede encontrar su explicación en la estructura de ambas de proteínas, donde el Loop 1 podría estar ocupando la zona de la conexión impidiendo la reparación eficiente de la rotura (Ver Discusión).

A



B

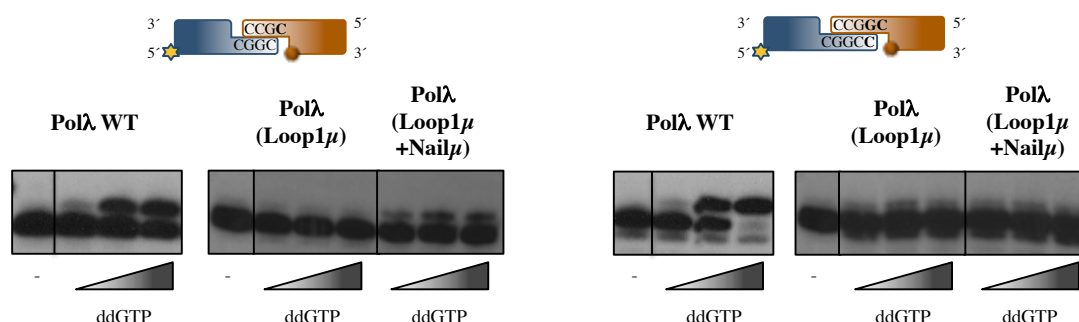


Figura 50. Actividad de Polλ(Loop1μ) y Polλ(Loop1μ+Nailμ) en NHEJ. Las reacciones se llevaron a cabo como se describe en Materiales y Métodos. **A.** El sustrato marcado (azul) está formado por hibridación del oligonucleótido NHEJ-C con NHEJ-D1 y el sustrato no marcado (naranja) por hibridación de NHEJ-2C con NHEJ-D2. La esfera naranja indica la presencia del grupo 5'P en la cadena *downstream* del sustrato. Las reacciones se incubaron durante 30 min a 30 °C en presencia de 2,5 mM Mg²⁺, 10 μM ddNTPs y 200 nM Polμ y durante 60 min a 30 °C en presencia de 0,1 mM Mn²⁺, 100 μM ddNTPs y 500 nM de cada variante de Polλ. **B.** El sustrato marcado (azul) está formado por hibridación del oligonucleótido D3 y D3+C respectivamente con D1 y el sustrato no marcado (naranja) por hibridación de D4-C y D4-GC respectivamente con D2. Las reacciones se incubaron durante 60 min a 30 °C, en presencia 0,1 mM Mn²⁺ y 500 nM de DNA polimerasa. La concentración de ddGTP fue de 10 nM, 100 nM y 1 μM cuando la conexión es de 3 pb (izquierda) y 1 nM, 10 nM y 100 nM cuando la conexión es de 4 pb en el caso de Polλ y de 1 μM, 10 μM y 100 μM en el caso de Polλ(Loop1μ) y Polλ(Loop1μ+Nailμ).

3.6 La ausencia de Loop 1 de Polλ disminuye la eficiencia en el proceso de NHEJ

En el capítulo 1 hemos visto como aumenta la eficiencia de la reacción de NHEJ cuando aumentamos la complementariedad de los extremos de DNA de 3 a 4 pb. Las estructuras cristallográficas disponibles demuestran las interacciones existentes entre el Loop 1 y la cadena molde del DNA en la zona *upstream* del sitio catalítico y cómo éstas cambian en función de si simulamos dos extremos cuyas protuberancias son compatibles en 3 o 4 pb. Gracias a la colaboración con la Dra. Katarzyna Bebenek (Research Triangle Park, North Carolina, USA), hemos podido completar el estudio sobre la función del Loop 1 de Polλ. En Polλ-DL el Loop 1 de Polλ ha sido cambiado por los 4 residuos correspondientes a la misma región de Polβ (Figura 51A), de forma que esta vez obtenemos una variante de Polλ sin Loop 1. Estudios recientes sobre Polλ-DL revelan que el Loop 1 de Polλ no es esencial para la catálisis pero juega un papel muy importante en la fidelidad y en el proceso de NHEJ (Bebenek et al., 2010).

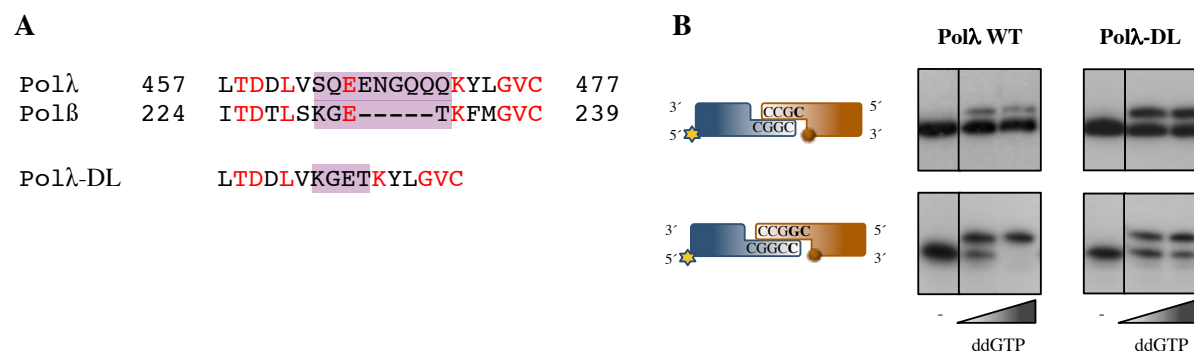


Figura 51. Actividad NHEJ en extremos complementarios de Polλ-DL. **A.** Alineamiento de la región del Loop 1 de Polλ y Polβ. Se destacan en rojo los residuos más conservados y con fondo malva los 9 residuos de Polλ que fueron intercambiados por los 4 de Polβ. **B.** El sustrato marcado (azul) está formado por hibridación del oligonucleótido D3 y D3+C respectivamente con D1 y el sustrato no marcado (naranja) por hibridación de D4-C y D4-GC respectivamente con D2. La esfera naranja indica la presencia del grupo 5'P en la cadena *downstream* del sustrato. Las reacciones se incubaron durante 60 min a 30 °C, en presencia de 0,1 mM Mn²⁺, 500 nM DNA polimerasa y a 0,1 μM y 1 μM ddGTP.

Quisimos comprobar si el incremento en la eficiencia de NHEJ cuando la unión es de 4 pb se observaba también en Polλ-DL. En el ensayo *in vitro* en ausencia de los factores auxiliares, Polλ-DL fue capaz de completar la reacción de reparación de forma eficiente (**Figura 51B**). El hecho de que el porcentaje de inserción de ddGTP de Polλ-DL fuera superior al de Polλ en complementariedad de 3 pb encuentra su explicación en que la actividad específica de Polλ-DL es superior a la de Polλ (Bebenek et al., 2010). Sin embargo, aunque al aumentar la complementariedad a 4 pb, la reacción de NHEJ continuó teniendo lugar, Polλ-DL no experimentó un aumento de la eficiencia en este tipo de conexión. Recordemos que el Loop 1 de Polλ establece 3 interacciones cuando la conexión es de 3 pb y 4 interacciones cuando el número de bases apareadas es 4. Polλ-DL disminuye del número de interacciones con la zona de la conexión como consecuencia de la pérdida de su Loop 1. En una rotura con 3 pb de conexión, Polλ-DL establece una sola conexión a través del residuo K463 con la base molde T₄ (**Figura 52A**). Al aumentar a 4 las bases apareadas es el residuo T466 el que interacciona con la base molde T₃ (**Figura 52B**). El descenso del número de interacciones con la zona de conexión en Polλ-DL impide su máxima eficiencia durante la reparación de DSBs mediante NHEJ.

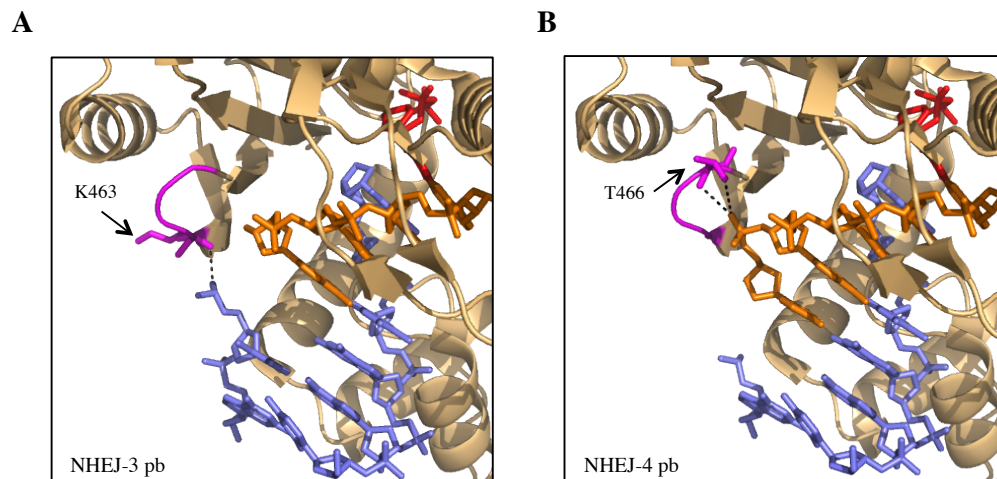


Figura 52. Interacciones de Polλ-DL con la zona de la conexión en NHEJ. A. Simulación de la reacción de NHEJ con 3 pb partiendo del complejo ternario de Polλ-DL (PDB id 1MGI). Se detalla la interacción del residuo K463 que ahora forma parte de la región del Loop 1 con el DNA. D. Simulación de la reacción de NHEJ con 4 pb partiendo de la misma estructura que en A. Se detallan las interacciones del residuo K463 que ahora forma parte de la región del Loop 1 con la zona de la conexión. En ambos casos la región del Loop 1 deletionada se detalla en color magenta y los colores del DNA se muestran siguiendo el mismo código que hasta ahora: el sustrato marcado en azul y el sustrato no marcado en naranja. El nucleótido se

Quisimos además determinar si la pérdida del Loop 1 afectaba a la preferencia de Polλ-DL en cuanto a la distancia existente entre los dos *gaps* de la rotura y la longitud de los mismos. Así, utilizando sustratos en los que alteramos ambos parámetros observamos que Polλ-DL no presenta mayor afinidad por ninguna de las conexiones ensayadas. Polλ-DL fue capaz de completar la reacción de reparación aún cuando los *gaps* están más alejados de lo habitual o cuando alguno de ellos es mayor de un nucleótido (Figura 53). El aumento de la eficiencia catalítica de Polλ-DL respecto a Polλ favorece la reparación de las roturas en cada una de las situaciones. Sin embargo, el hecho de que Polλ-DL no tenga preferencia por ninguno de los extremos analizados, encuentra su explicación en la ausencia del Loop 1, determinante en la capacidad de Polλ de unir correctamente ambos extremos de DNA aún cuando las condiciones no son las idóneas.

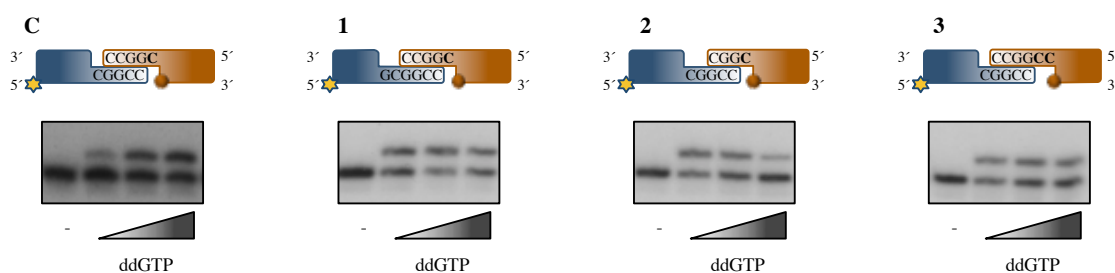


Figura 53. Polλ-DL y las variaciones en la sinapsis. Las reacciones se llevaron a cabo como se describe en Materiales y Métodos. Se indica con una “c” el caso control, y con número sobre los sustratos cada una de las variaciones. El sustrato marcado (azul) está formado por hibridación del oligonucleótido D3+C con D1 para el control (c) y para las variaciones 2 y 3, y por hibridación de D3+C con D1-1 para la variación 1. El sustrato no marcado (naranja) está formado por hibridación de D4-GC con D2 para el caso control (c) y para la variación 1, por hibridación de D4-C con D2 para la variación 2 y por hibridación de D4-GC con D2-1 para la variación 3. La esfera naranja indica la presencia del grupo 5'P en la cadena *downstream* del sustrato. Las reacciones se incubaron durante 60 min a 30 °C, en presencia de 500 nM de DNA polimerasa, 0,1 mM Mn²⁺ y 10 nM, 100 nM y 1 μM ddGTP para el control, y 100 nM, 1 μM y 10 μM ddGTP para cada una de las variaciones.

4

*Implicación del “broche” de $\text{Pol}\lambda$
en su función*

4.1 Cambios conformacionales de las DNA polimerasas durante su ciclo catalítico

Las diferentes familias de DNA polimerasas comparten una baja identidad de secuencia. Sin embargo, las estructuras tridimensionales de polimerasas de todas las familias revelan una similar organización de los dominios en forma de mano derecha (*dedos*, *pulgar* y *palma*) así como un mecanismo de actuación como nucleotidil transferasas común. Estudios estructurales en miembros de las diferentes familias demuestran un cambio conformacional en ausencia-presencia del nucleótido. Este ajuste inducido por la presencia del nucleótido implica el “cierre” de las polimerasas mediante cambios de posición relativos en los dominios *dedos* y *pulgar* (Sawaya et al., 1997; Doublié et al., 1999; Li et al., 1998). El paso de conformación “abierta” a “cerrada” favorece la interacción de importantes residuos conservados del dominio *dedos* con el nucleótido entrante. Las DNA polimerasas usan además este cambio estructural como punto de control de la fidelidad de la reacción, ya que la presencia de un nucleótido incorrecto provoca una alteración en la geometría de la conformación “cerrada” (Joyce, 2004).

En la Familia X de DNA polimerasas Pol β también experimenta este cambio estructural. Un elemento adicional que contribuye a la estabilidad de la conformación “cerrada” en Pol β es el dominio de 8 kDa. En *gaps* de pequeño tamaño, la interacción entre residuos de este dominio con residuos del *pulgar* modifican la actividad catalítica de Pol β y determinan su afinidad por el nucleótido y su fidelidad de síntesis (Vande Berg et al., 2001). Comparando las estructuras tridimensionales disponibles de las polimerasas de la Familia X, observamos que el cambio estructural solo se produce en Pol β (Figura 54A). La estructura tridimensional de TdT en ausencia de DNA muestra que esta polimerasa adquiere una conformación “cerrada” aún cuando no está unida al mismo (Delarue et al., 2002) (Figura 54B). La caracterización estructural de Pol λ muestra que su durante ciclo catalítico no se producen cambios conformacionales tan grandes como en el caso de Pol β ; Pol λ presenta una conformación “cerrada” tanto en ausencia como en presencia del nucleótido (García-Díaz et al., 2004; García-Díaz et al., 2005) (Figura 54D). La mayoría de los residuos implicados en estos cambios conformacionales están conservados en ambas polimerasas. Sin embargo la interacción entre la Arg⁴²⁰ y la Lys⁴²² del dominio *palma* y el Asp⁵⁷⁴ del *pulgar* de Pol λ no está presente en Pol β . Esta interacción puede ser una de las causas por las que Pol λ mantiene una conformación “cerrada” aún en ausencia del nucleótido. En el caso de Pol μ solo disponemos de la estructura en complejo ternario, donde se observa una conformación “cerrada” similar al caso de Pol λ (Figura 54C). Estudios de predicción de estructuras muestran además que Pol μ se encuentran en conformación “cerrada” en ausencia de DNA (Li & Schlick 2010).

Comparando las estructuras disponibles y estudiando alineamientos múltiples de secuencia hemos podido identificar un motivo presente en Pol λ , Pol μ y TdT pero ausente en Pol β , que podría ayudar a mantener la conformación “cerrada” de estas polimerasas a lo largo de su ciclo catalítico,

actuando como un “*broche*”. Este motivo, formado por cinco aminoácidos, es diferente en Pol λ (WVCAQ) y en Pol μ (YACQR) y TdT pero está muy conservado en estas polimerasas en diferentes especies (**Figura 55A**). Se encuentra en la zona N-terminal del *core* tipo Pol β y aunque ausente en las estructuras tridimensionales de Pol λ (Garcia-Diaz et al., 2004) sí lo encontramos en el cristal de Pol μ de ratón (Moon et al., 2007).

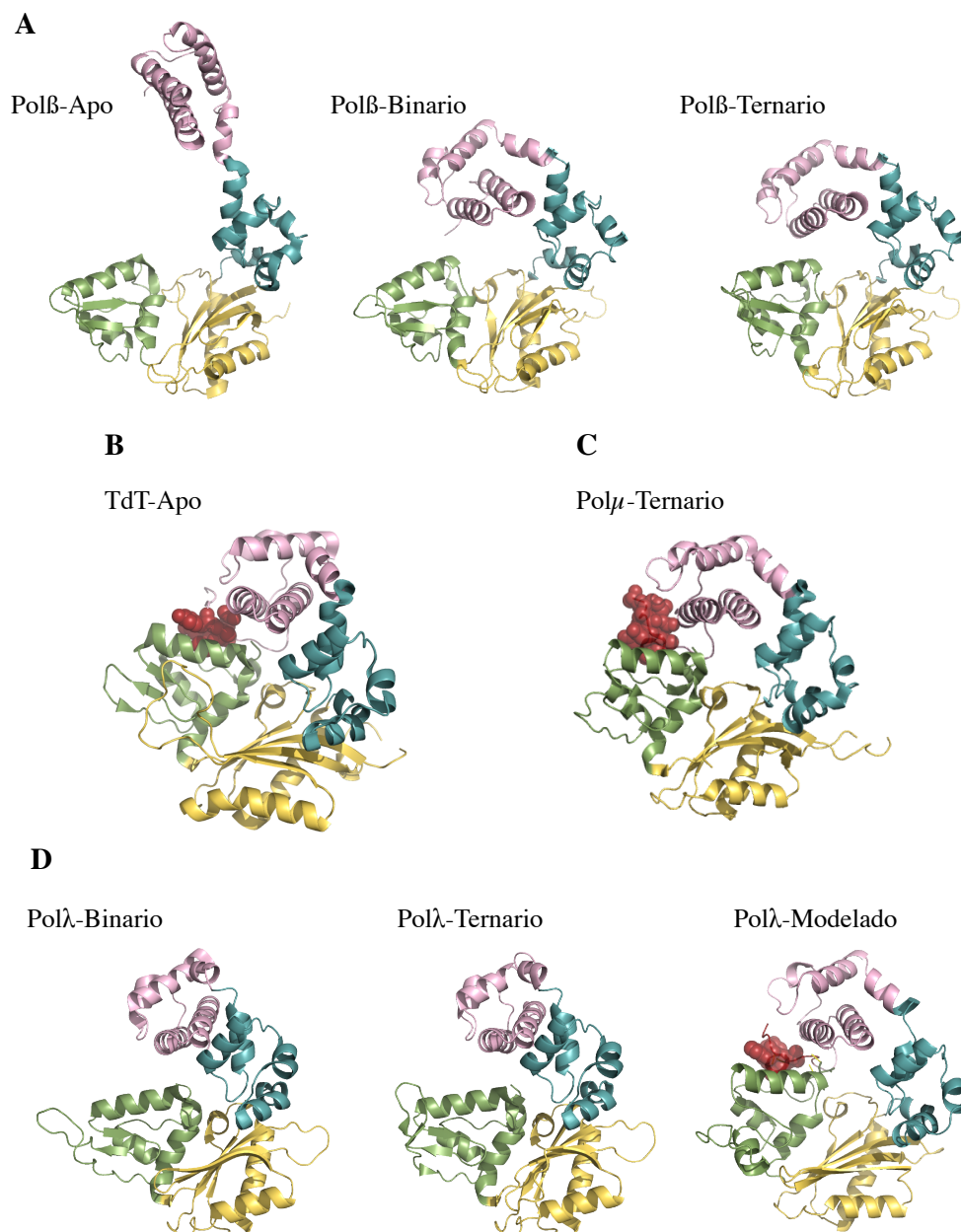


Figura 54. Estructuras tridimensionales de Pol β , TdT, Pol μ y Pol λ a lo largo de su ciclo catalítico. Los dominios se muestran en los siguientes colores: 8 kDa en rosa, *dedos* en azul, *palma* en amarillo y *pulgar* en verde. Se destaca en esferas y en rojo la zona del *broche* cuando está presente. **A.** Cambios conformacionales de Pol β a lo largo de su ciclo catalítico: apoenzima, complejo binario y ternario (PDB id 1BPD, 1BPX y 1BPY respectivamente). **B.** Representación de TdT de ratón, apoenzima (PDB id 1JMS) **C.** Representación del complejo ternario de Pol μ de ratón (PDB id 2IHM) **D.** Representación de Pol λ en complejo binario y ternario (PDB id 1XSL y 1XSN respectivamente).

La Dra. María José Martín estudió durante su Tesis Doctoral este motivo en Pol μ , determinando su importancia en la reparación de roturas de doble cadena mediante NHEJ de extremos no complementarios. En Pol μ los residuos de este motivo establecen una compleja red de interacciones con residuos del *pulgar* y del dominio 8 kDa (Martin et al., 2013). Así, la Tyr¹⁴¹ interacciona con los residuos del *pulgar* Lys⁴⁵⁰ y Glu⁴⁵¹ además de con la Gln¹⁴⁴ de esta misma región. Por su parte la Arg¹⁴⁵ interacciona con residuos Pro¹³⁹ y Ala¹⁴⁰ y con la Ser¹⁸⁴ situada en el dominio de 8 kDa.

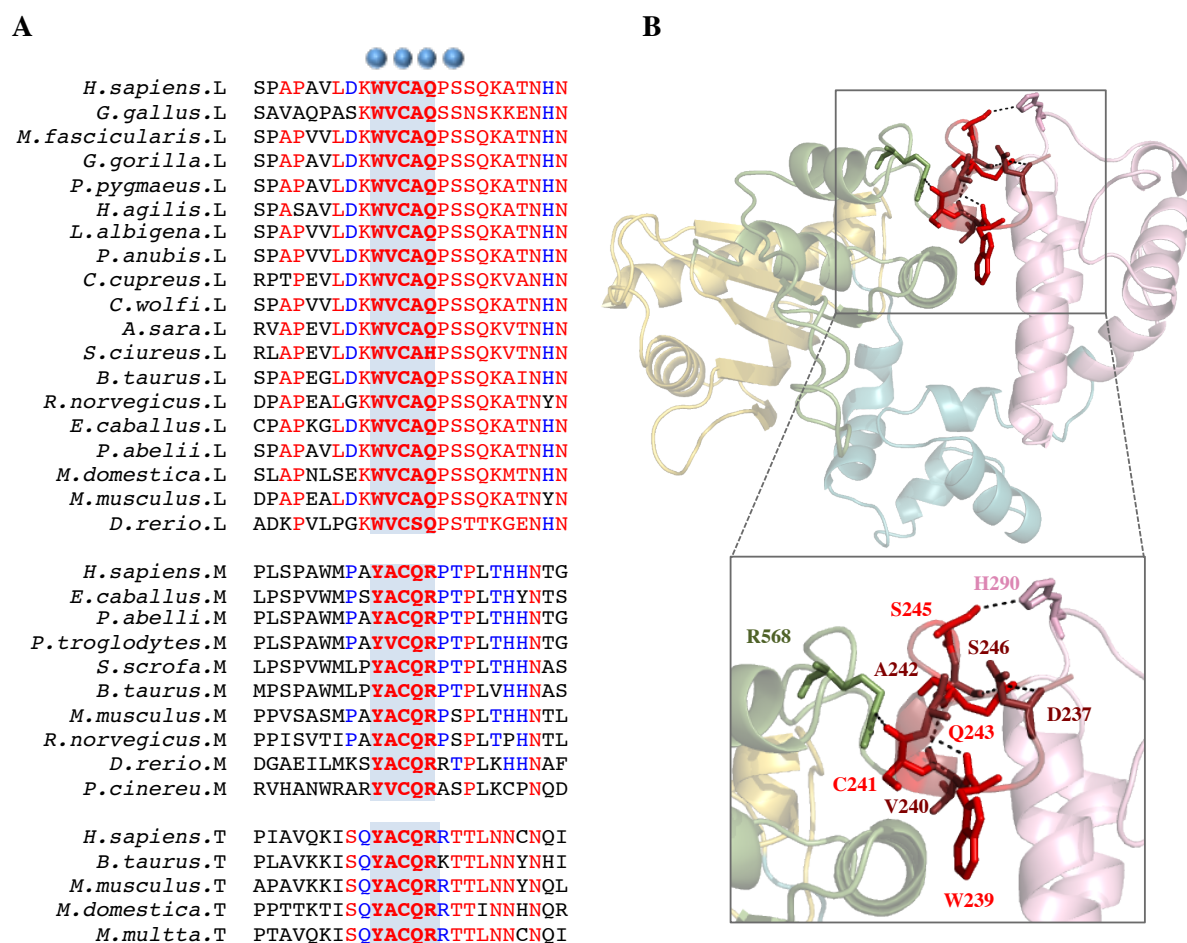


Figura 55. Conservación del motivo *broche* en las diferentes especies. **A.** Alineamiento múltiple de secuencias Pol λ (L), Pol μ (M), TdT (T) y Pol β (B). Los residuos invariantes se muestran en rojo y azul según el grado de conservación. El motivo *broche* se resalta en negrita y encuadrado en azul. Las esferas azules indican los residuos estudiados. **B.** Modelado de la estructura de Pol λ sobre Pol μ (PDI id 2HM) y detalle de las interacciones del motivo *broche* con residuos adyacentes y de los dominios 8 kDa y *pulgar*. Los dominios se muestran en los siguientes colores: 8 kDa en rosa, *dedos* en azul, *palma* en amarillo y *pulgar* en verde.

Debido a que la región del *broche* de Pol λ no se observa en las estructuras tridimensionales disponibles, para poder estudiar las interacciones potenciales que se producen en Pol λ en este dominio se hizo una predicción utilizando como modelo el cristal de Pol μ (PDB id 2IHM) (http://swissmodel.expasy.org/workspace/index.php?func=modelling_simple1) (**Figura 54D**). Observamos que en Pol λ los residuos de este dominio también podrían establecer interacciones con

residuos tanto del *pulgar* como del dominio 8 kDa. Este modelo muestra interacciones entre el Trp²³⁹ y la Ala²⁴² presente en este mismo motivo; entre la Cys²⁴¹ y la Arg⁵⁶⁸ del *pulgar*; entre la Gln²⁴³ y la Ser²⁴⁶, el Aps²³⁷ y la Val²⁴⁰ del *broche* y la Ser²⁴⁵ y la His²⁹⁰ del dominio 8 kDa (**Figura 55B**).

El estudio de la implicación de este motivo en la función de Polλ se realizó mediante mutagénesis dirigida. Las mutaciones fueron: Trp²³⁹ a Tyr, residuo presente en Polμ; Cys²⁴¹ a Ser y la Gln²⁴³ a Arg, residuo también presente en Polμ, manteniendo su tamaño y estructura pero cambiando su carga. Además, en este estudio se incluyó la Ser²⁴⁵, residuo muy conservado en Polλ y potencialmente implicado en el mantenimiento de esta red de interacciones y por tanto de la conformación “cerrada” de la proteína. Fue mutado a Thr, aminoácido presente y muy conservado en Polμ. Todos estos residuos fueron mutados a su vez a Gly para abolir completamente su función.

4.2 El *broche* de Polλ es prescindible en sustratos tipo GAP1P

Los mutantes puntuales del motivo *broche* de Polλ W239Y, W239G, C241S, C241G, Q243R, Q243G, S245T y S245G fueron clonados y purificados como se describe en Materiales y Métodos. Antes de estudiar el efecto de la modificación de la arquitectura del motivo WVCAQ en la actividad de Polλ, quisimos comprobar si esta alteración traía como consecuencia una variación en la capacidad de unión de los mutantes al DNA. Para ello, llevamos a cabo un ensayo de retraso en gel, como se describe en Materiales y Métodos, en un sustrato idóneo para Polλ, un *gap* de un nucleótido con un grupo 5'P. Todas las proteínas ensayadas fueron capaces de generar complejos estables E:DNA, por lo que aunque la arquitectura de la proteína haya sido alterada, todos los mutantes presentaron afinidad por este tipo de DNA (**Figura 56**).

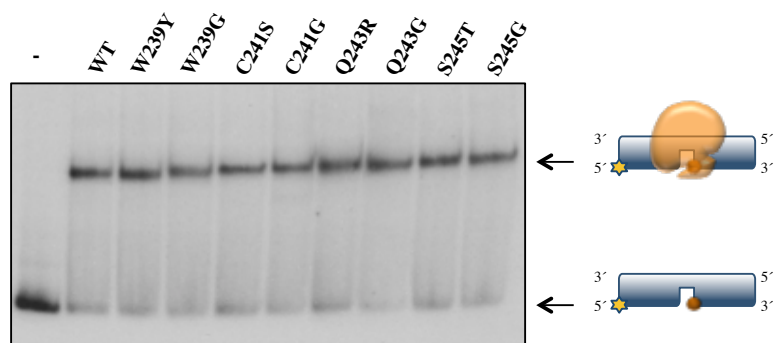


Figura 56. Capacidad de unión a un GAP1P de los mutantes del *broche*. El sustrato utilizado se muestra en la parte inferior derecha. Las reacciones se llevaron a cabo como se describe en Materiales y Métodos, a 30 °C durante 15 min y 300 nM de cada DNA polimerasa. Tras la electroforesis a 4 °C, los geles se secaron y se revelaron por autorradiografía.

Tras comprobar que los mutantes obtenidos mantenían la afinidad por un sustrato de DNA tipo GAP1P, quisimos analizar su capacidad de polimerizar en este sustrato óptimo para Polλ. Como se observa en la **figura 57** todos los mutantes fueron capaces de llevar a cabo la polimerización. Sin

embargo, algunos de ellos presentaron una actividad ligeramente inferior a la de Pol λ WT. Destaca el mutante C241S, con una actividad aproximadamente del 60%. En este tipo de sustratos los mutantes que presentaron un comportamiento más similar al de Pol λ WT son el W239Y y el W239G. Al no verse drásticamente afectada la actividad de los mutantes en este tipo de sustrato, podemos afirmar que el *broche* no es imprescindible en sustratos GAP1P.

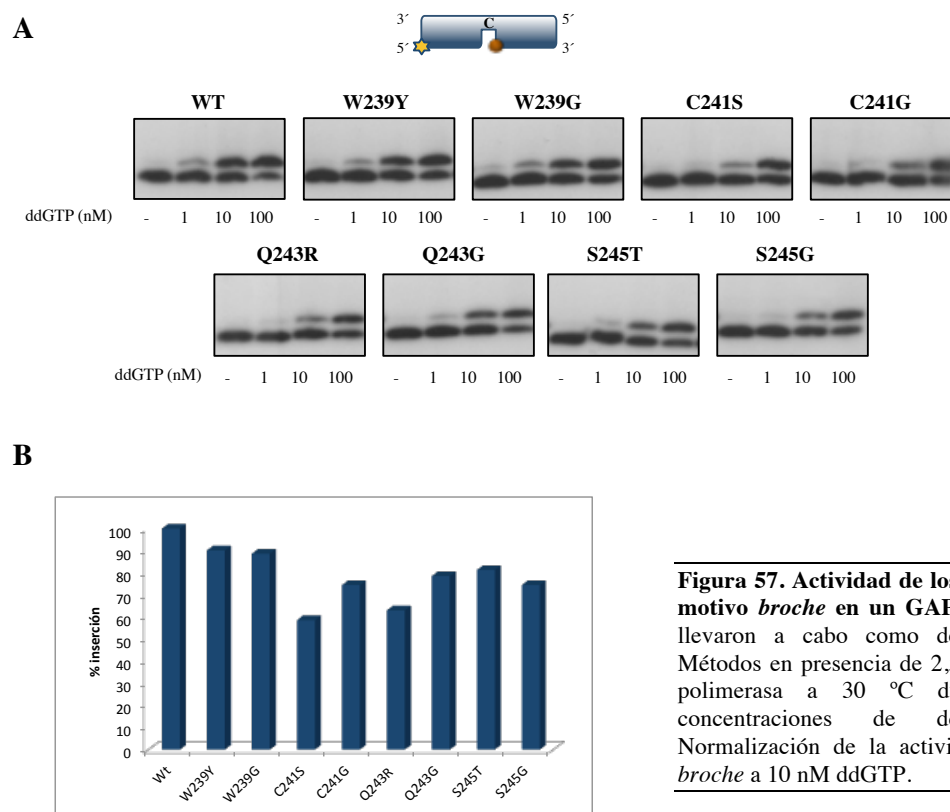


Figura 57. Actividad de los mutantes puntuales del motivo *broche* en un GAP1P. A. Las reacciones se llevaron a cabo como describe en Materiales y Métodos en presencia de 2,5 mM Mg²⁺, 50 nM DNA polimerasa a 30 °C durante 20 min y las concentraciones de ddGTP indicadas. B. Normalización de la actividad de los mutantes del *broche* a 10 nM ddGTP.

4.3 El *broche* favorece el *scrunching* de Pol λ

Para profundizar en el comportamiento de estos mutantes y en cómo puede verse afectada la función de Pol λ al alterar la arquitectura de esta región de la proteína, estudiamos la capacidad de polimerización de los mutantes en sustratos de DNA con *gaps* mayores de 1 nucleótido (concretamente de 5 nucleótidos), sin y con grupo P en su extremos 5'. Los mutantes más afectados en este tipo de sustratos fueron los cambios a Gly y el C241S (**Figura 58B**). A pesar de poseer una actividad de polimerización más baja que la Pol λ WT observamos que todos los mutantes respondieron a la presencia del grupo 5'P. De todas las proteínas ensayadas el mutante W239Y tuvo un comportamiento prácticamente igual al de Pol λ WT. Al sustituir los iones Mg²⁺ por iones Mn²⁺ encontramos que la actividad de los mutantes aunque estimulada, se vio afectada respecto a la Pol λ WT (**Figura 58C**). En este caso la caída más acusada la encontramos en el sustrato GAP5OH y de nuevo los mutantes a Gly y el C241S fueron los más afectados.

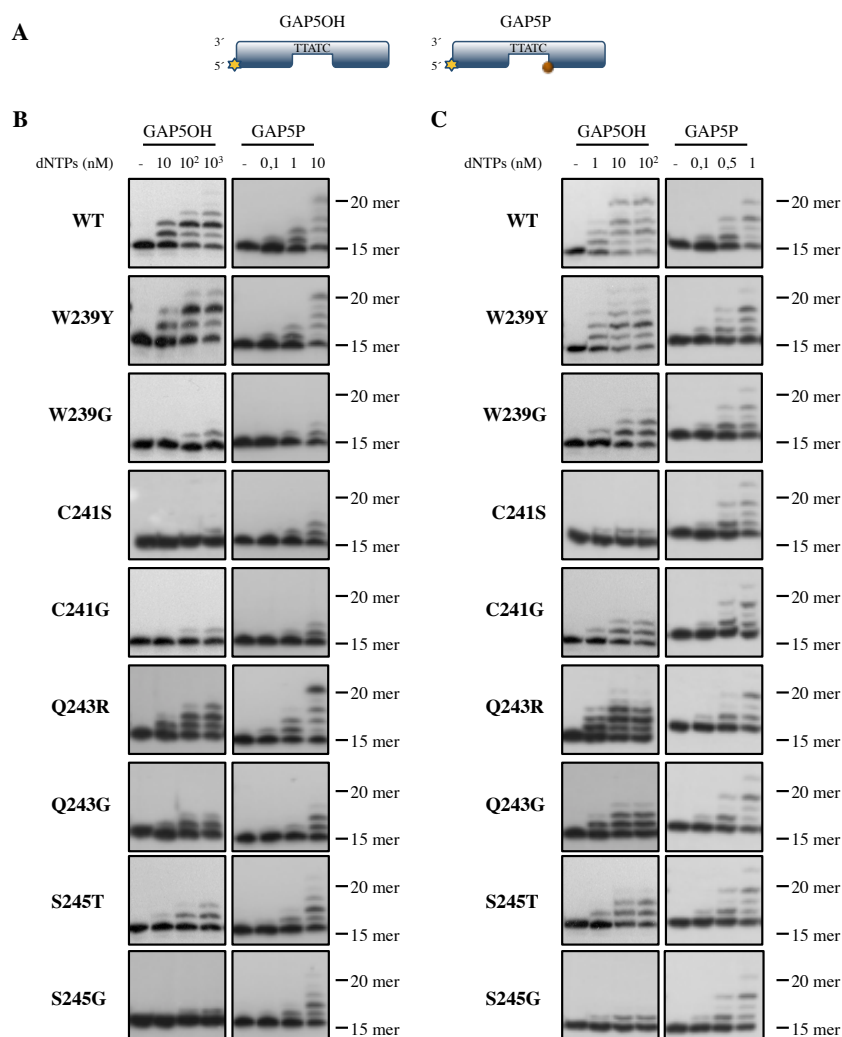


Figura 58. Implicación del *broche* en el mecanismo de *scrunching*. **A.** Los sustratos empleados fueron un *gap* de 5 nucleótidos sin el grupo fosfato en posición 5' (GAP5OH) y un sustrato *gap* de 5 nucleótidos con un grupo fosfato en posición 5' (GAP5P) representado por una esfera naranja. **B.** Las reacciones se llevaron a cabo como se describe en Materiales y Métodos en presencia de 2,5 mM Mg²⁺, 50 nM DNA polimerasa y 10 nM, 100 nM y 1000 nM dNTPs en M/I y GAP5OH y 0,1 nM, 1 nM y 10 nM dNTPs en GAP5P. **C.** Las reacciones se llevaron a cabo como se describe en Materiales y Métodos en presencia de 1 mM Mn²⁺, 50 nM DNA polimerasa y 1 nM, 10 nM y 100 nM dNTPs en M/I y GAP5OH y 0,1, nM 0,5 nM y 1 nM dNTPs en GAP5P. En todos los casos las reacciones se incubaron a 30°C durante 20 min.

Para que Polλ pueda llevar a cabo reacciones en sustratos tipo *gap* de más de un nucleótido, debe producirse una distorsión de la hélice de DNA de manera que la base a continuación de la base molde quede fuera de la misma, estabilizada por el denominado bolsillo de *scrunching* (Garcia-Diaz et al., 2009). Este bolsillo se encuentra muy cerca del motivo del *broche* por lo que al alterar la arquitectura de esta región podemos estar modificando a su vez la conformación del mismo y por tanto comprometiendo la habilidad de Polλ para polimerizar correctamente en este tipo de sustratos. Analizando la afinidad de los mutantes de Polλ por un sustrato de DNA con un *gap* de 5 nucleótidos y un extremo 5'P, observamos que dista mucho de la mostrada por Polλ WT (Figura 59) y a su vez es también menor que en *gaps* de menor tamaño (Figura 56). En concordancia con el resultado de

actividad, la unión más débil a este tipo de DNA la encontramos en los cambios a Gly y en el mutante C241G. De nuevo destaca el mutante W239Y, con un comportamiento similar a Polλ WT.

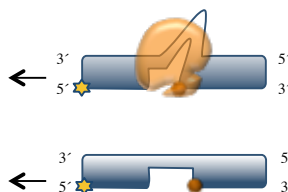
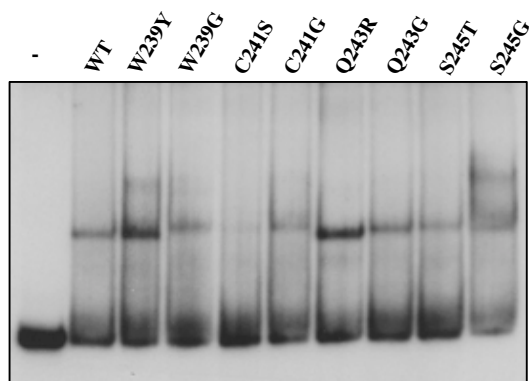


Figura 59. Capacidad de unión a un GAPSP de los mutantes del broche. El sustrato utilizado se muestra en la parte inferior derecha. Las reacciones se llevaron a cabo como se describe en Materiales y Métodos, a 30 °C durante 15 min y 300 nM DNA polimerasa. Tras la electroforesis a 4 °C, los geles se secaron y se revelaron por autorradiografía.

4.4 El motivo *broche* es esencial para Polλ en las reacciones de NHEJ

Como se ha descrito en el capítulo 1 Polλ es capaz de llevar a cabo reacciones de reparación de roturas de doble cadena mediante NHEJ en ausencia de factores accesorios. La conformación “cerrada” de la proteína podría ser especialmente importante durante las reacciones de NHEJ donde Polλ debe unir los dos extremos del DNA. Por tanto, podríamos esperar que una reacción tan precisa se viera afectada por la variación en la estructura de la proteína al mutar los residuos de la región del *broche*. Para verificar esta hipótesis comenzamos por analizar la capacidad de los mutantes de completar reacciones de NHEJ en sustratos cuyos extremos de DNA son complementarios en 3 pb. La actividad de estos mutantes prácticamente es indetectable en este tipo de sustratos independientemente de si el metal presente en la reacción es Mg^{2+} o Mn^{2+} . Solo los mutantes W239Y y Q243R presentan una actividad de NHEJ superior al 50% respecto a la observada para Polλ WT en presencia de Mn^{2+} (Figura 60A). Al aumentar la conectividad de los extremos de DNA de 3 a 4 pb, y siendo el Mg^{2+} el metal presente en la reacción, llama la atención la eficiencia de los mutantes W239Y y S245G, muy similar a Polλ WT (Figura 60B). El resto de los mutantes presentó una actividad muy baja (C241G y Q243R) o incluso indetectable (W239G, C241S y Q243G). La presencia de iones Mn^{2+} en este tipo de conexión favorece la actividad de todos los mutantes a excepción de los mutantes W239G y C241S (Figura 60B, panel de la izquierda). La tabla de la figura 60C muestra el porcentaje de inserción de cada uno los mutantes en las condiciones ensayadas. A la vista de los resultados obtenidos, podemos concluir que la correcta arquitectura de la región del *broche* y por tanto las correctas interacciones entre unos dominios y otros de Polλ es fundamental para que las roturas de doble cadena sean reparadas mediante NHEJ.

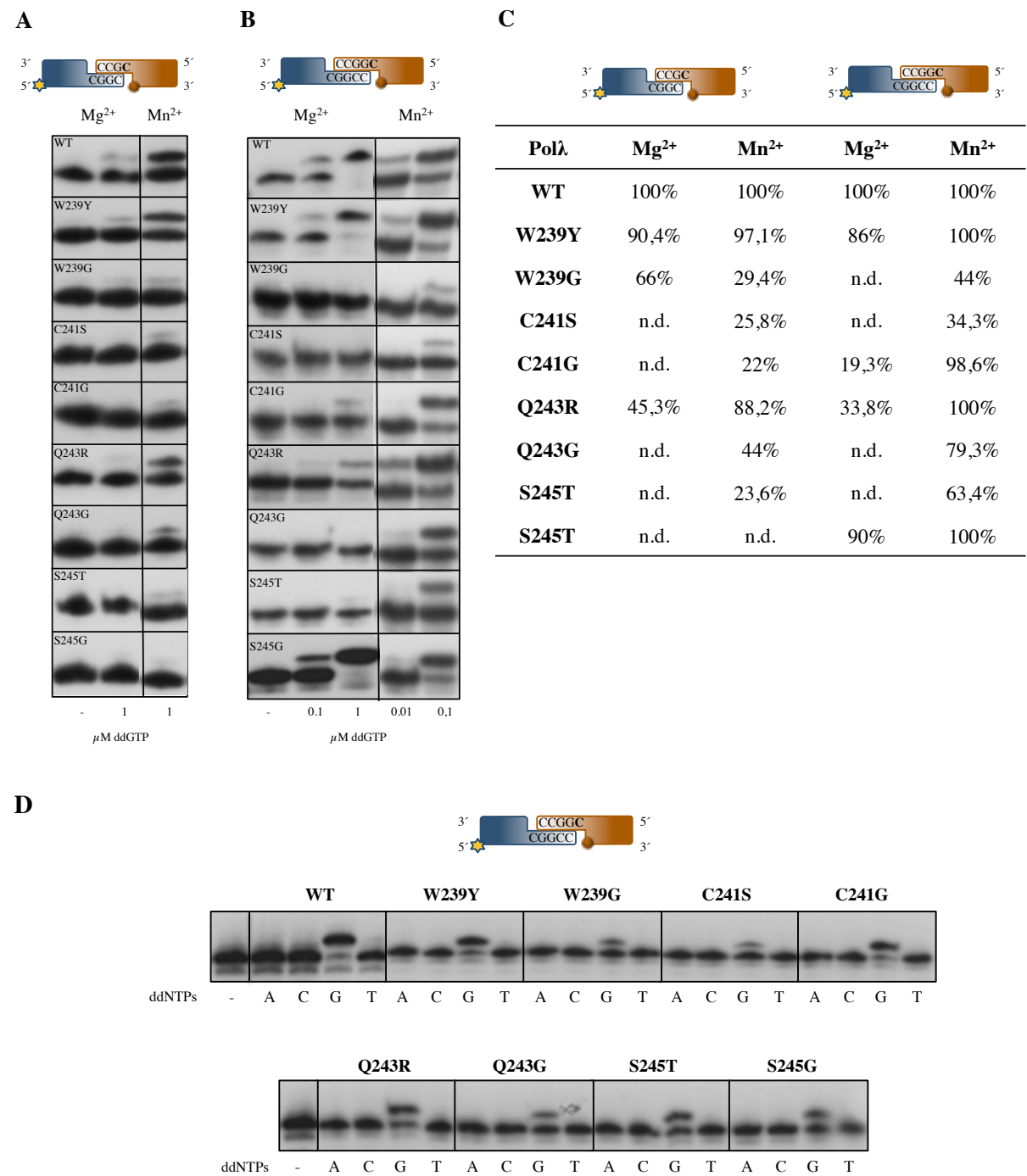


Figura 60. La región del *broche* es imprescindible para la reparación mediante NHEJ. A. El sustrato marcado (azul) está formado por hibridación del oligonucleótido D3 y D3+C respectivamente con D1 y el sustrato no marcado (naranja) por hibridación de D4-C y D4-GC respectivamente con D2. Las reacciones se llevaron a cabo como se describe en Materiales y Métodos, a 30 °C, 1h y 500 nM DNA polimerasa en presencia de 2,5 mM Mg²⁺ o 0,1 mM Mn²⁺. Las concentraciones de ddGTP se indican en cada caso. **C.** Normalización de la actividad NHEJ respecto a Polλ WT a 1 μM ddGTP excepto en la complementariedad de 4 pb en presencia de Mn²⁺ (0,1 μM). **D.** Fidelidad de la reacción de NHEJ. Las reacciones se llevaron a cabo como en A en presencia de 500 nM DNA polimerasa y 0,1 mM Mn²⁺ y 100 nM ddNTPs.

A pesar de ser en algunos casos el porcentaje de inserción de ddGTP muy bajo en conexiones de 4 pb, quisimos comprobar la fidelidad de los mutantes en este tipo de reacciones en presencia iones

Mn²⁺. Todos los mutantes presentaron una inserción fiel, incorporando únicamente el nucleótido correcto (ddGTP), dirigido por la base molde (dC) (**Figura 60D**).

4.5 Mutaciones puntuales en el *broche* alteran la estructura de la polimerasa

En apartados anteriores hemos descrito como la alteración de la región del *broche* por mutaciones puntuales no es relevante en reacciones óptimas para Polλ como es el relleno de *gaps* de un nucleótido. Sin embargo, esta región es fundamental para reacciones en las que se requiere el relleno de *gaps* más largos y por tanto llevar a cabo el mecanismo de *scrunching* y durante las reacciones de NHEJ, donde la polimerasa debe reunir dos extremos de DNA y rellenar completamente el *gap* que queda entre ellos. La correcta conformación “cerrada” de la polimerasa es necesaria para la unión del nucleótido y posterior catálisis en este tipo de reacciones. Como ya hemos mencionado, no hay información estructural sobre esta región de Polλ para observar con claridad cómo podrían estar afectando las mutaciones a la arquitectura de la región. Sin embargo, al encontrarse el *broche* entre el dominio Ser/Pro y el dominio de 8 kDa podemos suponer que las mutaciones puedan distorsionar esta zona de unión entre el dominio BRCT y el *core*, quedando más expuesta al solvente y siendo más sensible a proteasas. Mediante un ensayo de proteólisis parcial pudimos observar un patrón de bandas diferente entre Polλ WT y el mutante W239G (uno de los más afectados en las reacciones de NHEJ) (**Figura 61**). Polλ WT produjo un patrón en el que podemos observar una banda definida a la altura del *core* tipo Polβ (**Figura 61**, asteriscos rojos) mientras que en el mutante W239G, esta banda parece desglosarse en dos, apareciendo una banda de mayor movilidad que la que migra a la altura del *core* tipo Polβ (**Figura 61** punta de flecha).

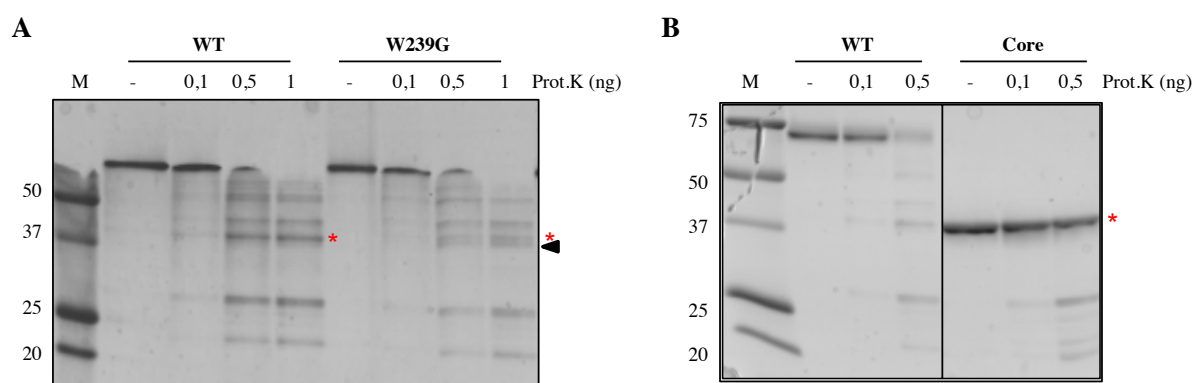


Figura 61. Proteólisis parcial de Polλ. El ensayo se llevó a cabo como se describe en Materiales y Métodos. En la parte superior se indica la cantidad de Proteinasa K utilizada en los ensayos. La punta de flecha indica la altura de la nueva banda de proteólisis. **A.** Proteólisis parcial de Polλ y el mutante W239G. **B.** Proteólisis parcial de Polλ y Polλ-core.

La aparición de esta nueva banda solo puede ser interpretada por un aumento de la sensibilidad a proteasas del mutante W239G, quizás por un cambio en la conformación de la proteína como consecuencia de la mutación. Por tanto, podemos concluir que la alteración de la región del *broche* provoca un cambio global en la estructura global de Pol λ .

5

El dominio BRCT en la función de $Pol\lambda$

5.1 El dominio BRCT y la Familia X de DNA polimerasas humanas

El dominio BRCT es un dominio estructural muy abundante, encontrado en más de 1000 proteínas de los diferentes reinos. Casi todas las proteínas que lo poseen participan en los procesos de regulación del ciclo celular en respuesta a daño en el DNA y más concretamente en los mecanismos de replicación y reparación del mismo (Bork et al., 1997; Callebaut & Mornon, 1997). El dominio BRCT se caracteriza por presentar una estructura típica conocida como “sándwich $\alpha\beta$ ”, en la que 4 láminas β paralelas están flanqueadas por 3 hélices α (Zhang et al., 1998). De las DNA polimerasas que forman la Familia X, Polλ, Polμ y TdT poseen en posición N-terminal un dominio BRCT. Las estructuras cristalográficas de los BRCT de estas 3 polimerasas, muestran que la estructura tipo “sándwich $\alpha\beta$ ” se conserva. Sin embargo, la superposición de las mismas pone de manifiesto sus diferencias. Además, llama la atención la baja conservación de su estructura primaria: 23% entre Polλ y Polμ y 20% entre Polλ y TdT. De los residuos que forman el BRCT solo 10 de ellos se conservan en las 3 polimerasas (**Figura 62**): 5 de ellos están directamente implicados en la arquitectura del dominio, mientras que los otros 5 se encuentran en la superficie del dominio teniendo algunos de ellos un papel importante a la hora de establecer interacciones proteína-proteína. En la última década se han llevado a cabo diversos los análisis estructurales de este dominio en Polλ y Polμ, que han demostrando las diferencias existentes entre los mismos (Derosé et al., 2007; Mueller et al., 2008). La relación de este dominio con la función de ambas polimerasas durante la reparación de DSBs mediante NHEJ también ha sido demostrada (Fan & Wu, 2004; Nick McElhinny et al., 2005). Además, estudios recientes han puesto de manifiesto la unión directa del dominio BRCT de Polμ con la zona cercana al grupo 5'P del DNA, favoreciendo así la acción de Polμ durante NHEJ (Martin et al., 2012).

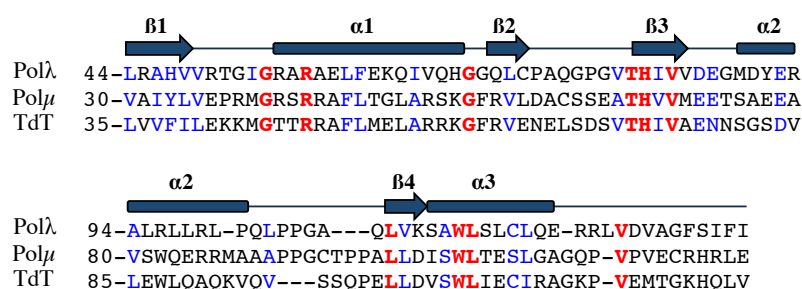


Figura 62. Alineamiento de secuencia de los dominios BRCT de Polλ, Polμ y TdT. Los residuos estrictamente conservados se muestran en negrita y en rojo, en azul se destacan otros menos conservados. En la parte superior del alineamiento se muestra la estructura secundaria en forma de láminas β (flechas) y hélices α (rectángulos). Los números corresponden a la posición de los residuos desde el extremo N-terminal de cada proteína.

El dominio BRCT de Polλ está unido al *core* tipo Polβ por una región de unos 100 aminoácidos ricos en residuos Ser, Thr y Pro (Dominio Ser/Pro). Predicciones estructurales sugieren que es una región flexible y accesible, susceptible de coordinar interacciones proteína-proteína y ser regulada mediante fosforilación (Frouin et al., 2005).

Con el objetivo de ahondar en la especificidad de los dominios BRCT de Pol λ y Pol μ en sus funciones durante NHEJ hemos diseñado dos proteínas quiméricas en las que el dominio BRCT de Pol λ junto con su dominio Ser/Pro ha sido sustituido por el BRCT de Pol μ . Tras determinar la importancia del *broche* tanto en la función de Pol λ (analizada en el capítulo anterior) como en la función de Pol μ (Martin et al., 2013) una de las proteínas quiméricas mantendrá la región del broche correspondiente a Pol λ [WVCAQ, Pol λ (BRCT μ)] mientras que en la segunda, se intercambiará, además del dominio BRCT esta región de Pol λ por la correspondiente de Pol μ [YACQR, Pol λ (BRCT μ +YACQR μ)] (Figura 63).

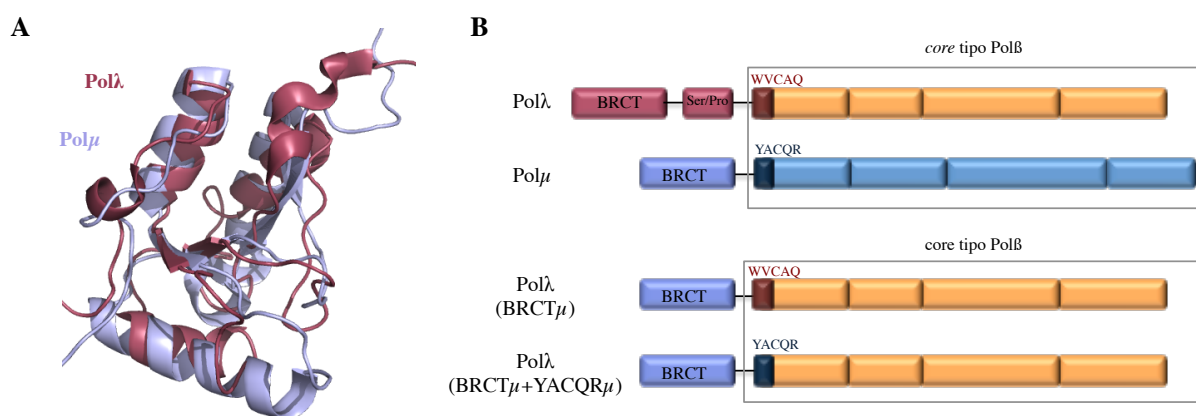


Figura 63. El dominio BRCT en Pol λ y Pol μ . **A.** Superposición de la estructura en *cartoon* del BRCT de Pol λ (grosella; PDB id 2JW5) y de Pol μ (malva; PDB id 2DUN), observándose las diferencias entre ambos. **B.** Esquema de la estructura primaria de Pol λ y Pol μ donde se muestra el *core* tipo Pol β destacando la región del *broche* (WVCAQ e YACQR respectivamente) y los dominios adicionales BRCT y Ser/Pro. En la parte inferior se representa el esquema de la estructura primaria de las proteínas quiméricas obtenidas: Pol λ (BRCT μ) y Pol λ (BRCT μ +YACQR μ).

5.2 El dominio BRCT de Pol λ y Pol μ es intercambiable

Tras obtener ambas quimeras tal y como se describe en Materiales y Métodos, quisimos evaluar si el intercambio de los dominios BRCT tenía como consecuencia una alteración en la actividad de polimerización de Pol λ . Para ello utilizamos dos tipos de sustratos: el primero de ellos es un *gap* de 5 nucleótidos con un grupo 5'P donde podemos observar si el patrón de síntesis se modifica; el segundo, un GAP1P nos permite evaluar si la capacidad de inserción se ve alterada en el mejor sustrato para Pol λ . Tanto Pol λ (BRCT μ) como Pol λ (BRCT μ +YACQR μ) fueron capaces de rellenar un GAP5P presentando un comportamiento comparable a Pol λ WT (Figura 64A). Sin embargo, observamos que Pol λ (BRCT μ), en presencia de Mg²⁺, requirió una dosis mayor de dNTPs para completar el relleno del *gap*. Cuando el sustrato es un GAP1P, ambas quimeras presentaron una eficiencia de inserción menor que Pol λ WT, siendo la capacidad de inserción de Pol λ (BRCT μ) la menor de ambas proteínas quiméricas (Figura 64B). En la zona lineal de la reacción (5 nM de ddTTP) la inserción de ddTTP de Pol λ (BRCT μ) fue del 55% respecto a Pol λ , mientras que la inserción de ddTTP de Pol λ (BRCT μ +YACQR μ) fue del 86%.

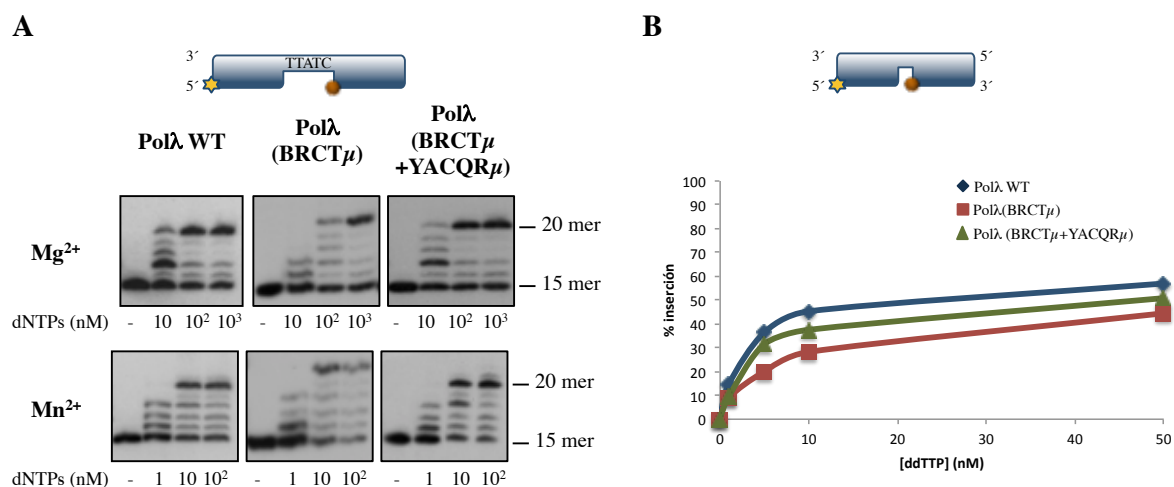


Figura 64. Actividad de Polλ(BRCTμ) y Polλ(BRCTμ+YACQRμ). **A.** Actividad en un GAP5P. Las reacciones se llevaron a cabo como se describe en Materiales y Métodos en presencia de 2,5 mM Mg²⁺, 10 nM, 100 nM y 1000 nM dNTPs ó 1 mM Mn²⁺ y 1 nM, 10 nM y 100 nM dNTPs. **B.** Actividad en un GPA1P. Las reacciones se llevaron a cabo en presencia de 2,5 mM Mg²⁺ y 1 nM, 5 nM, 10 nM y 50 nM ddTTP. En ambos casos las reacciones se incubaron a 30 °C durante 20 min y a una concentración de 50 nM DNA polimerasa.

5.3 Unión de Polλ(BRCTμ) y Polλ(BRCTμ+YACQRμ) al DNA

La presencia del dominio BRCT de Polμ no altera demasiado la actividad de Polλ. Sin embargo, es posible que la afinidad por el DNA haya cambiado notoriamente ya que no solo hemos intercambiado los dominios BRCT sino que hemos eliminado la región Ser/Pro de Polλ. Ensayos de retraso en gel en un GAP1P demostraron la formación de complejos estables E:DNA tanto para Polλ(BRCTμ) como para Polλ(BRCTμ+YACQRμ). Sin embargo, el patrón de unión al DNA no fue el mismo en ambos casos. A pesar de presentar una actividad menor que Polλ WT, Polλ(BRCTμ) presenta una afinidad por el DNA más comparable a la misma (Figura 65, comparar carriles 2, 3 con 6, 7 y 9, 10). La aparición de bandas de mayor retraso (destacadas como *) fue también comparable en ambos casos (Figura 65, carriles 3, 4 y 7, 8). Por su parte, Polλ(BRCTμ+YACQRμ) formó complejos estables E:DNA pero su comportamiento fue más parecido al observado para Polλ-core, es decir sin dominio BRCT, ni Ser/Pro ni la región del broche. La formación de bandas de mayor retraso tampoco fue la misma que para Polλ WT. Las pequeñas diferencias observadas tanto en actividad como en la capacidad de unión al DNA entre Polλ(BRCTμ) y Polλ(BRCTμ+YACQRμ) podrían venir dadas por la región del *broche*, diferente en cada una de ellas. La importancia de esta región queda por tanto aún más patente a la vista de estos resultados.

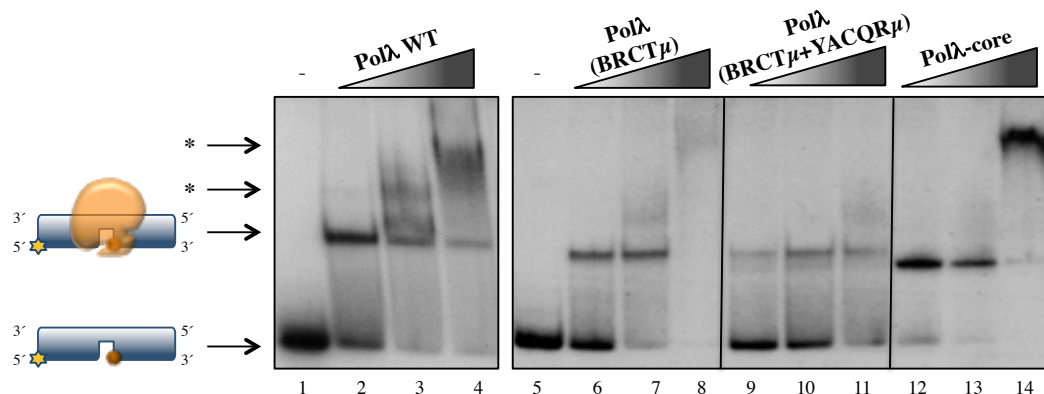


Figura 65. Unión de Polλ(BRCTμ) y Polλ(BRCTμ+YACQRμ) a un GP1P. Las reacciones se llevaron a cabo como se describe en Materiales y Métodos empleando el sustrato indicado, a 30 °C durante 15 min. Las dosis de DNA polimerasas fueron: 300 nM, 600 nM y 1,2 μM. Tras la electroforesis a 4 °C, los geles se secaron y se revelaron por autorradiografía.

Por la especial relevancia del dominio BRCT en la unión a sustratos de DNA intermediarios de reacciones de NHEJ (Martin et al., 2012), quisimos estudiar si la capacidad de formar complejos estables E:DNA de Polλ en este tipo de sustratos varía por la presencia del BRCT de Polμ. Polμ presentó una elevada afinidad por estos sustratos, formando dichos complejos de manera estable (Figura 66). Polλ apenas formó complejos visibles en estas condiciones. Sin embargo, Polλ-core sí se unió de manera estable a estos intermediarios de NHEJ. Por su parte, Polλ(BRCTμ+YACQRμ) presentó un comportamiento intermedio entre Polλ y Polλ-core: fue capaz de formar un complejo estable E:DNA dando lugar a una banda de retraso más definida que Polλ (Figura 66, carriles 5 y 7); no obstante se requieren dosis de proteína más elevadas que en el caso de Polλ-core. Estos resultados demuestran que el dominio BRCT junto con la región Ser/Pro de Polλ interfieren en la formación de complejos E:DNA observables en estas condiciones. Al eliminar estas dos regiones (Polλ-core) la afinidad por el DNA aumenta, al igual que al intercambiar ambas zonas por el BRCT de Polμ.

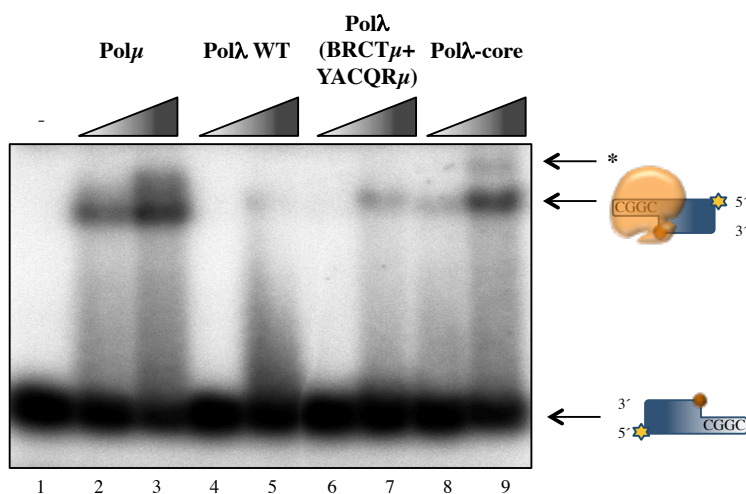


Figura 66. Unión a intermediarios de NHEJ. Las reacciones se llevaron a cabo como se describe en Materiales y Métodos a 30 °C durante 15 min, en presencia de 2,5 mM Mg²⁺ y 0,6 μM y 1,2 μM de cada proteína. El oligonucleótido marcado fue D3 hibridado con D1-P. Tras la electroforesis a 4 °C, los geles se secaron y se revelaron por autorradiografía

5.4 Reparación por NHEJ mediada por Polλ(BRCTμ) y Polλ(BRCTμ+YACQRμ)

Recientemente se ha descrito la implicación directa del dominio BRCT en la reparación de DSBs mediada por Polμ (Martin et al., 2012). Hemos visto que el BRCT de Polμ favorece la unión de Polλ a intermediarios de NHEJ, por lo que nos preguntamos si este dominio repercutiría también en la reparación mediada por Polλ. En reacciones donde los extremos de DNA dejan extremos incompatibles o con 1 solo par de bases de complementariedad la presencia del BRCT de Polμ no alteró el comportamiento de Polλ en este tipo de sustratos (no mostrado). Sin embargo, al estudiar la actividad de reparación en extremos de DNA con 3 y 4 pb complementarios, observamos que el comportamiento de Polλ(BRCTμ) y Polλ(BRCTμ+YACQRμ) si se vio alterado. Ambas proteínas quiméricas disminuyeron su capacidad de reparación independientemente de la complementariedad de bases y del metal presente en la reacción (**Figura 67**).

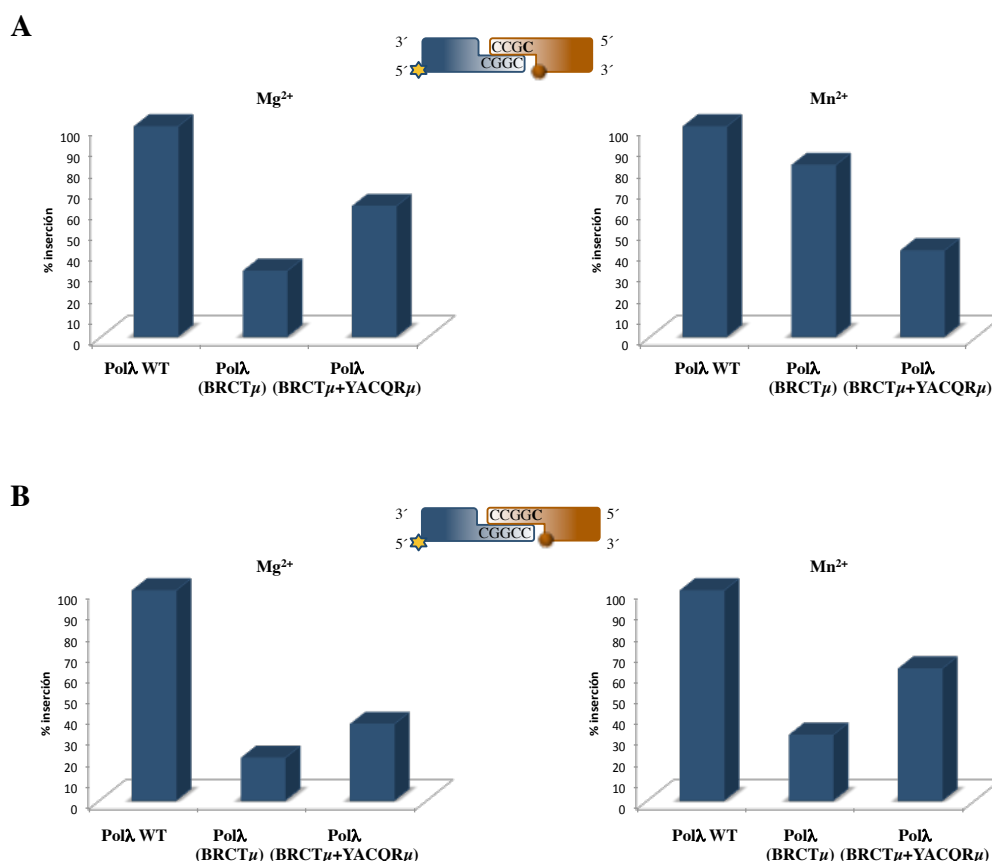


Figura 67. Reparación por NHEJ mediada por Polλ(BRCTμ) y Polλ(BRCTμ+YACQRμ). El sustrato marcado (azul) está formado por hibridación del oligonucleótido D3 con D1 (**A**) y D3+C con D1 (**B**) y el sustrato no marcado (naranja) por hibridación de D4-C con D2 (**A**) y D4-GC con D2 (**B**). La esfera naranja indica la presencia del grupo 5'P en la cadena *downstream* del sustrato. En ambos casos las reacciones se llevaron a cabo como se describe en Materiales y Métodos, a 30 °C, 1h y 500 nM DNA polimerasa en presencia de 2,5 mM Mg²⁺ o 0,1 mM Mn²⁺ y a 1 μM ddGTP salvo cuando la conexión es de 4 pb en presencia de Mn²⁺ donde la concentración de ddGTP fue de 100 nM.

Llama la atención que la caída de la actividad fue mayor en Polλ(BRCTμ) que en Polλ(BRCTμ+YACQRμ) solo en presencia de iones Mg²⁺. El uso del Mn²⁺ no disminuyó la diferencia en la eficiencia de la reparación entre Polλ WT y Polλ(BRCTμ+YACQRμ). Sin embargo, Polλ(BRCTμ) si respondió a la presencia de iones Mn²⁺, aumentando su eficiencia en ambos extremos de DNA. A la vista de los resultados obtenidos podemos afirmar que el BRCT de Polμ aumenta la afinidad por los intermediarios de NHEJ pero no la catálisis para llevar a cabo este tipo de reacciones. De nuevo el comportamiento diferente de Polλ(BRCTμ) y Polλ(BRCTμ+YACQRμ) deja patente la importancia y la especificidad de la región del *broche*.

6

Caracterización de polimorfismos simples de $Pol\lambda$

6.1 Variantes y polimorfismos simples en las DNA Polimerasas humanas

Las DNA polimerasas están implicadas en el mantenimiento y la estabilidad del genoma mediante sus funciones en replicación, reparación, recombinación y síntesis a través de lesiones. Alteraciones en los genes que codifican para las DNA polimerasas pueden tener como consecuencia alteraciones en el fenotipo celular y por tanto consecuencias en la salud humana. Se define como polimorfismo simple (Single Nucleotide Polymorphism o SNP) la variación en la secuencia del DNA que está presente en al menos el 1% de la población. Tanto las mutaciones adquiridas (somáticas) en los genes que codifican para las DNA polimerasas, como las variaciones naturales (germinales) de los mismos, han sido objeto de estudio en los últimos años llegándose a conocer más de 120 polimorfismos simples asociados a estas enzimas (revisado en Sweasy et al., 2006). Dentro de la Familia A, mutaciones en el gen *POLG1* que codifica para la subunidad catalítica de Polγ (PolγA) están asociadas a enfermedades neurodegenerativas y a la oftalmoplejía externa progresiva (PEO) (Longley et al., 2005). En individuos que padecen esta enfermedad ha sido descrito uno de los 9 polimorfismos simples conocidos en el gen *POLG1*. Mutaciones en la subunidad catalítica de Polδ (Familia B) han sido asociadas a cáncer de colon (Flohr et al., 1999; da Costa et al., 1995). Se conocen 8 polimorfismos simples de esta polimerasa, los cuales podrían estar afectando a la fidelidad y eficiencia del enzima así como a su capacidad de adquirir la conformación necesaria para la catálisis o de interaccionar con otras proteínas implicadas en los procesos de replicación y reparación. Alteraciones en los genes que codifican para las polimerasas de la Familia Y pueden tener como consecuencia un aumento de la inestabilidad genómica y por tanto del riesgo de padecer cáncer, especialmente si se ve alterada la capacidad de tolerar lesiones en el DNA. De los 6 polimorfismos simples que se conocen en el gen de Polκ (*POLK*), 3 de ellos se encuentran en la región C-terminal, una región crítica para la regulación de las proteínas de esta familia.

6.2 Variantes y polimorfismos simples en las DNA Polimerasas de la Familia X

6.2.1 Variantes y polimorfismos simples en Polβ

De las polimerasas que forman la Familia X, la más estudiada en cuanto a sus variantes y a su relación con procesos de tumorigénesis y cáncer es Polβ. Se han descrito diferentes variantes de *splicing* de Polβ (Chyan et al., 1994), algunas de ellas asociadas a tumorigénesis (Srivastava et al., 1999; Wang et al., 1992). Sin embargo, estudios posteriores ponen de manifiesto la presencia de variantes de *splicing* de Polβ en tejidos tanto normales como tumorales aunque en distinta proporción (Stracevic et al., 2004; Thompson et al., 2002). Por otra parte, se ha descrito que algunas variantes de *splicing* de Polβ podrían actuar como dominantes negativos, favoreciendo una tasa elevada de mutaciones (Bhattacharyya et al., 1997). Además de estas variantes de Polβ, se han descrito

numerosas mutaciones en el gen que codifica para esta polimerasa relacionadas con diferentes tipos de cáncer. Así, encontramos que la mutación Y265C produce un fenotipo más mutador de Pol β y la I260M está asociada al cáncer de próstata. Estudios recientes han puesto de manifiesto el gran número de mutaciones de Pol β asociadas al cáncer de colon (Donigan et al., 2012). Existen además 4 polimorfismos naturales de Pol β . Uno de ellos, Q8R, está presente en el dominio de 8 kDa y podría alterar la actividad dRP liasa o la capacidad de unión al DNA por parte de Pol β . Las variantes R137Q y P242R están presentes con una frecuencia del 6% en la población de Asia del Este y del 2% en la población europea, respectivamente (Guo et al., 2009; Sweasy et al., 2006; Yamtich et al., 2010). La variante R137Q presenta una disminución de actividad y se une de forma aberrante al PCNA, lo que hace que presente un defecto en BER (Guo et al., 2009). Tanto la variante P242R como la K289M están asociadas a cáncer de mama y pueden ser usadas como marcadores diagnósticos de la enfermedad (Sliwinski et al., 2007).

6.2.2 Variantes y polimorfismos simples en Pol μ

De los polimorfismos de Pol μ que encontramos en las bases de datos podemos destacar que 5 de ellos han sido descritos en la bibliografía con anterioridad (Sweasy et al., 2006). Sin embargo, hasta la fecha no se ha descrito relación alguna de estas variantes con enfermedades humanas. Una de estas variantes, D107E, está situada en el dominio BRCT, implicado en la interacción de esta polimerasa con los factores de NHEJ. Por ello, es posible que este polimorfismo pueda alterar la función de Pol μ en reparación de roturas de doble cadena por el mecanismo de NHEJ, y tenga como consecuencia un aumento de la inestabilidad genómica.

6.2.3 Variantes y polimorfismos simples en Pol λ

La DNA polimerasa Pol λ presenta el mayor número de polimorfismos dentro de la Familia X. En la **figura 69** se muestran los diferentes polimorfismos de esta DNA polimerasa identificados hasta la fecha en la base de datos http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?geneId=27343.

Algunos de los polimorfismos Pol λ han sido objeto de estudios con el fin de determinar si estas alteraciones están relacionadas con la predisposición a padecer cáncer (Enjuanes et al., 2008). La Dra. Gloria Terrados identificó y caracterizó una de estas variantes, R438W, en su tesis doctoral, en colaboración con el grupo del Dr. Jean-Sébastien Hoffmann (CNRS, Toulouse, France). Este polimorfismo no afecta la actividad dRP liasa y tampoco la capacidad de polimerización de la Pol λ humana. Sin embargo, sí produce un incremento en la tasa de error durante la síntesis. Además, la expresión de la variante R438W en células de mamífero incrementa la frecuencia de mutación e induce aberraciones cromosómicas, comprometiendo la reparación de roturas de doble cadena por NHEJ y provocando un aumento de la inestabilidad genómica (Terrados et al., 2009). Por otra parte, se ha visto que la expresión en células de mamífero de este polimorfismo provoca un aumento en la

sensibilidad celular al agente antitumoral Captotecina, afectando a la vía de reparación por Recombinación Homóloga y perjudicando por tanto al respuesta celular al daño en el DNA (Capp et al., 2010).

Los polimorfismos simples de Polλ mapean a lo largo de toda su secuencia, encontrándose tanto en el *core* tipo Polβ como en dominios adicionales como el BRCT o el dominio Ser/Pro (Figura 68). Este es el caso de la variación T221P que aunque no ha sido caracterizada, ha llamado la atención de diversos autores por poder estar alterando la capacidad de interacción de Polλ con los factores de NHEJ o con el DNA (Sweasy et al., 2006). Además, algunos de los aminoácidos para los que se ha descrito variaciones poseen importantes funciones como la Tyr⁵⁰⁵, implicada en la selectividad del azúcar (Brown et al., 2010).

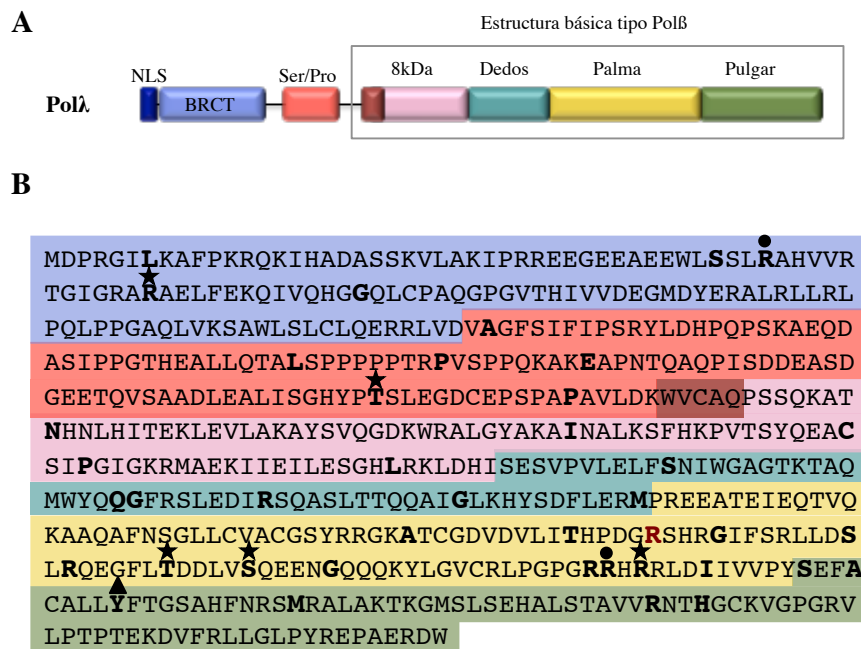


Figura 68. Mapeo de los polimorfismos simples de Polλ. **A.** Esquema de la estructura primaria de Polλ donde se muestra su dominio de polimerización formado por los dominios *dedos*, *palma* y *pulgar* y los dominios adicionales (dominio Ser/Pro, BRCT y secuencia de localización nuclear, NLS). **B.** Secuencia aminoácida de Polλ humana. Los diferentes dominios se encuentran enmarcados de la siguiente forma: en morado el dominio BRCT, en rojo el dominio Ser/Pro, en granate el motivo WVCAQ, en azul el dominio *dedos*, en amarillo el dominio *palma* y en verde el dominio *pulgar*. Los polimorfismos simples de Polλ que codifican para un cambio de aminoácido se indican en negrita. En rojo se destaca el polimorfismo R438W previamente descrito. Los puntos negros indican los residuos para los que se han descrito más de una variante. El triángulo indica el residuo con una función conocida y descrita (Y505). Las estrellas indican los polimorfismos que serán estudiados en este capítulo.

SNP linked to Gene POLL(geneID:27343) Via Contig Annotation

Send

rs# on all gene models to Batch Query

Download

all rs# to file.

Genotype

Gene Model (mRNA alignment) information from genome sequence

Total gene model (contig mRNA transcript):

1

mrna

transcript

protein

mrna orientation

Contig

Contig Label

List SNP

NM_013274.3plus strandNP_037406.1forwardNT_030059.13GRCh37.p5<- currently shown

☐ Clinical Source

☐ in gene region

☒ cSNP

☐ has frequency

☐ double hit

refresh

gene model

Contig Label

Contig

mrna

protein

mrna orientation

transcript

snp count

(contig mRNA transcript): GRCh37.p5NT_030059.13NM_013274.3NP_037406.1forwardplus strand88, coding

Chr. position	mrna pos	dbSNP rs# cluster id	Heterozygosity	Validation	MAF	Allele origin	3D	Linkout	Function	dbSNP allele	Protein residue	Codon pos	Amino acid pos
103339258	2112	rs144810871	0.000				Yes		synonymous	T	Phe [F]	3	560
									contig reference	C	Phe [F]	3	560
103339285	2085	rs200025326	N.D.				Yes		synonymous	T	Leu [L]	3	551
									contig reference	G	Leu [L]	3	551
103339293	2077	rs55978126	N.D.				Yes		nonsense	T	[Ter*]	1	549
									contig reference	C	Arg [R]	1	549
103339316	2054	rs148557018	0.000				Yes		missense	G	Arg [R]	2	541
									contig reference	A	His [H]	2	541
103339324	2046	rs111556691	0.500				Yes	I>	synonymous	A	Arg [R]	3	538
								I>	contig reference	G	Arg [R]	3	538
103339325	2045	rs202232099	N.D.				Yes		missense	A	Gln [Q]	2	538
									contig reference	G	Arg [R]	2	538
103339392	1978	rs202015509	N.D.				Yes		missense	G	Val [V]	1	516
									contig reference	A	Met [M]	1	516
103339424	1946	rs142581169	N.D.				Yes		missense	C	Ser [S]	2	505
									contig reference	A	Tyr [Y]	2	505
103339438	1932	rs200811650	N.D.				Yes		synonymous	T	Ala [A]	3	500
									contig reference	C	Ala [A]	3	500
103339440	1930	rs150453080	N.D.				Yes		missense	A	Thr [T]	1	500
									contig reference	G	Ala [A]	1	500
103339447	1923	rs145961723	N.D.				Yes		missense	A	Arg [R]	3	497
									contig reference	C	Ser [S]	3	497
103339467	1903	rs138242344	N.D.				Yes		missense	G	Val [V]	1	491
									contig reference	A	Ile [I]	1	491
103339479	1891	rs113383598	N.D.				Yes		missense	T	Trp [W]	1	487
									synonymous	A	Arg [R]	1	487
									contig reference	C	Arg [R]	1	487
103339484	1886	rs146653325	N.D.				Yes		missense	A	Gln [Q]	2	485
									contig reference	G	Arg [R]	2	485
103339485	1885	rs140396236	0.000				Yes		missense	T	Trp [W]	1	485
									contig reference	C	Arg [R]	1	485
103339487	1883	rs200705693	N.D.				Yes		missense	A	Gln [Q]	2	484
									contig reference	G	Arg [R]	2	484
103339495	1875	rs12779215	N.D.				Yes		synonymous	C	Gly [G]	3	481
									contig reference	G	Gly [G]	3	481
103339533	1837	rs201540862	N.D.				Yes		nonsense	T	[Ter*]	1	469
									contig reference	C	Gln [Q]	1	469
103339535	1835	rs149956893	N.D.				Yes		missense	A	Asp [D]	2	468
									contig reference	G	Gly [G]	2	468
103339550	1820	rs3209099	N.D.				Yes		missense	C	Thr [T]	2	463
									contig reference	G	Ser [S]	2	463
103339565	1805	rs80066411	0.500				Yes		missense	G	Arg [R]	2	458
									contig reference	C	Thr [T]	2	458
103340014	1786	rs200281533	N.D.				Yes		missense	T	Trp [W]	1	452
									contig reference	C	Arg [R]	1	452
103340020	1780	rs145030649	0.000				Yes		missense	G	Gly [G]	1	450
									contig reference	A	Ser [S]	1	450
103340043	1757	rs149081648	0.000				Yes		missense	C	Ala [A]	2	442
									contig reference	G	Gly [G]	2	442
103340056	1744	rs3730477	N.D.		0.1216		Yes	I>	missense	T	Trp [W]	1	438
								I>	contig reference	C	Arg [R]	1	438
103340070	1730	rs201665669	N.D.				Yes		missense	T	Ile [I]	2	433
									contig reference	C	Thr [T]	2	433

Figura 69. Polimorfismos asociados al gen humano POLL. Esquema de los diferentes polimorfismos asociados al gen de hPoll, publicados en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>. Los polimorfismos que alteran la secuencia de aminoácidos se indican en rojo, aquellos que producen cambios sinónimos en la proteína en verde y los que producen cambio en la pauta de lectura de proteína (frameshift) en azul.

103340081	1719	rs41562219	N.D.	X	0.0035	Yes	synonymous	T	Asp [D]	3	429
							contig reference	C	Asp [D]	3	429
103340099	1701	rs200263317	N.D.			Yes	synonymous	A	Ala [A]	3	423
							contig reference	G	Ala [A]	3	423
103340100	1700	rs142388822	0.000			Yes	missense	T	Val [V]	2	423
							contig reference	C	Ala [A]	2	423
103340117	1683	rs146361439	0.004	X		Yes	synonymous	C	Ser [S]	3	417
							contig reference	A	Ser [S]	3	417
103340144	1656	rs3730476	N.D.	X	0.1900	Yes	synonymous	C	Ser [S]	3	408
							contig reference	T	Ser [S]	3	408
103342523	1623	rs141596425	0.000			Yes	synonymous	A	Gln [Q]	3	397
							contig reference	G	Gln [Q]	3	397
103342555	1591	rs150900080	0.000			Yes	missense	G	Val [V]	1	387
							contig reference	A	Met [M]	1	387
103342588	1558	rs200623399	N.D.			Yes	missense	A	Ser [S]	1	376
							contig reference	G	Gly [G]	1	376
103342589	1557	rs41291484	N.D.	X		Yes	synonymous	T	Ile [I]	3	375
							contig reference	C	Ile [I]	3	375
103342613	1533	rs149619701	0.000			Yes	synonymous	T	Ala [A]	3	367
							contig reference	C	Ala [A]	3	367
103342623	1523	rs146112511	0.000			Yes	missense	A	His [H]	2	364
							contig reference	G	Arg [R]	2	364
103342642	1504	rs55727130	N.D.			Yes	nonsense	T	[Ter*]	1	358
							contig reference	C	Arg [R]	1	358
103342648	1498	rs139871590	N.D.	X		Yes	missense	A	Ser [S]	1	356
							contig reference	G	Gly [G]	1	356
103343265	1497	rs143224710	0.000			Yes	missense	C	His [H]	3	355
							contig reference	G	Gln [Q]	3	355
103343268	1494	rs183248417	N.D.			Yes	synonymous	G	Gln [Q]	3	354
							contig reference	A	Gln [Q]	3	354
103343314	1448	rs146197224	N.D.	X		Yes	missense	T	Phe [F]	2	339
							contig reference	C	Ser [S]	2	339
103343337	1425	rs148400497	N.D.	X		Yes	synonymous	T	Ser [S]	3	331
							contig reference	C	Ser [S]	3	331
103343366	1396	rs201742864	N.D.			Yes	missense	G	Val [V]	1	322
							contig reference	T	Leu [L]	1	322
103343373	1389	rs201019235	N.D.			Yes	synonymous	T	Ser [S]	3	319
							contig reference	C	Ser [S]	3	319
103343423	1339	rs142726673	N.D.	X		Yes	missense	T	Ser [S]	1	303
							contig reference	C	Pro [P]	1	303
103343432	1330	rs151004679	0.000			Yes	missense	A	Ser [S]	1	300
							contig reference	T	Cys [C]	1	300
103344392	1290	rs41540413	N.D.	X		Yes	synonymous	G	Leu [L]	3	286
103344403	1279	rs140868797	0.000			Yes	missense	G	Val [V]	1	283
103344429	1253	rs1444419506	0.001	X		Yes	nonsense	A	[Ter*]	2	274
103344498	1184	rs147811477	N.D.			Yes	missense	G	Ser [S]	2	251
103344553	1129	rs201860235	N.D.				missense	T	Ser [S]	1	233
103344587	1094	rs36010384	N.D.				frame shift	C	[TL]	2	221
103344589	1093	rs3730463	N.D.	X	0.0644		missense	C	Pro [P]	1	221
103344608	1074	rs146527045	N.D.				synonymous	T	Leu [L]	3	214
103345095	983	rs138738499	0.000				missense	T	Val [V]	2	184
							contig reference	A	Glu [E]	2	184
103345123	955	rs148922523	0.000				missense	T	Ser [S]	1	175
							contig reference	C	Pro [P]	1	175
103345150	928	rs200617884	N.D.				missense	T	Phe [F]	1	166
							contig reference	C	Leu [L]	1	166
103345231	847	rs187953670	N.D.	X			synonymous	C	Leu [L]	1	139
							contig reference	T	Leu [L]	1	139
103345647	814	rs201624181	N.D.				missense	A	Thr [T]	1	128
							contig reference	G	Ala [A]	1	128
103345669	792	rs201676435	N.D.				synonymous	A	Gln [Q]	3	120
							contig reference	G	Gln [Q]	3	120
103345720	741	rs143640062	0.000				synonymous	T	Leu [L]	3	103
							contig reference	G	Leu [L]	3	103
103345741	720	rs148170530	0.000				synonymous	A	Arg [R]	3	96
							contig reference	C	Arg [R]	3	96
103345821	640	rs143021263	0.000				missense	A	Ser [S]	1	70
							contig reference	G	Gly [G]	1	70
103345828	633	rs146124362	0.000				synonymous	A	Gln [Q]	3	67
							contig reference	G	Gln [Q]	3	67
103345860	601	rs61757734	N.D.	X			missense	T	Trp [W]	1	57
							contig reference	C	Arg [R]	1	57
103345895	566	rs141683033	N.D.	X			missense	A	Gln [Q]	2	45
							contig reference	G	Arg [R]	2	45
103345896	565	rs201767386	N.D.				missense	T	Trp [W]	1	45
							contig reference	C	Arg [R]	1	45
103345904	557	rs201211517	N.D.				missense	A	Asn [N]	2	42
							contig reference	G	Ser [S]	2	42
103347019	531	rs146209113	0.000				synonymous	A	Glu [E]	3	33
103347097	453	rs139055788	0.000				missense	C	Phe [F]	3	7
103347099	451	rs76674143	0.500				synonymous	C	Leu [L]	1	7

Además de estos polimorfismos simples de Pol λ , podemos encontrar en las bases de datos otras variantes de Pol λ que podrían estar asociadas a algunos tipos de cáncer, como el cáncer de mama. Es el caso de las variaciones T221S y S222F. El polimorfismo natural T221P también ha sido encontrado en estas bases de datos.

Cuando se inició el proyecto de estudio de los polimorfismos de Pol λ para esta Tesis Doctoral estaban descritas como variaciones que producen un cambio en la secuencia de aminoácidos (sin dar lugar a una proteína truncada) los siguientes polimorfismos:

- R57W. Cambio de C por T en la primera base del codón 57.
- T221P. Cambio de A por C en la primera base del codón 221.
- R438W. Cambio de C por T en la primera base del codón 438.
- T458R. Cambio de C por G en la segunda base del codón 458.
- S463T. Cambio de G por C en la segunda base del codón 463.
- R487W. Cambio de C por T en la primera base del codón 487.

Como se mencionó anteriormente, ya había sido caracterizada la variante Pol λ R438W (Terrados et al., 2009; Capp et al., 2010). A lo largo de este capítulo se describirá la caracterización bioquímica de los polimorfismos Pol λ R57W, T221P, T458R, S463T y R487W, además de las variantes T221S y S222F mencionadas anteriormente.

6.3 Las variantes y polimorfismos simples de Pol λ son activas y responden a la presencia del grupo P en el extremo 5' de un *gap*

Para caracterizar las variaciones R57W, T221P, T221S, S222F, T458R, S463T y R487W se realizó una mutagénesis dirigida sobre el vector de expresión que contiene el cDNA de la Pol λ humana, tal y como se ha descrito en Materiales y Métodos. Las construcciones obtenidas se sobre-expresaron en la cepa de *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-pRIL y se purificaron mediante técnicas cromatográficas (Ver Materiales y Métodos) (**Figura 70**). Todas las variantes mencionadas fueron purificadas a excepción de la Pol λ R57W que por problemas de solubilidad de la proteína finalmente no pudo ser purificada.

Pol λ se caracteriza por llevar a cabo una síntesis procesiva en *gaps* de pequeño tamaño (García-Díaz et al., 2002). Cuando en el extremo 5' del *gap* hay un grupo fosfato (P), la interacción del dominio de 8 kDa con este grupo P hace que Pol λ realice una síntesis procesiva frente a la distributiva que lleva a cabo en un sustrato molde/iniciador abierto. Esta estimulación por la presencia del grupo P se ha descrito también para otras polimerasas como Pol β o SpPol4 (Prasad et al., 1994; González-Barrera et al., 2005).

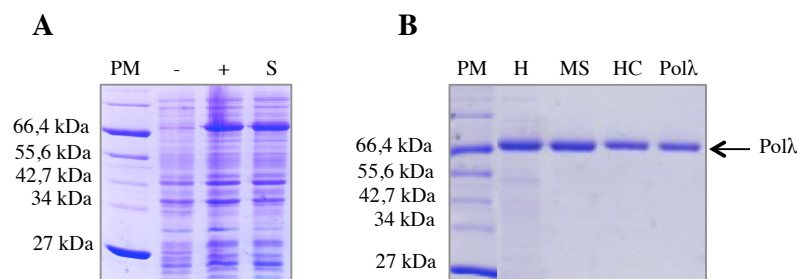


Figura 70. Purificación de Polλ y sus variantes en células de *E. coli*. Tinción con azul de Coomassie tras la separación electroforética en geles del 10% de poliacrilamida-SDS de los diferentes extractos de células *BL21 pRIL* transformadas con el vector pET22b-Polλ y sus variantes. **A.** La expresión de la proteína de interés se observa en el extracto inducido (+), mientras que está ausente en el no inducido (-). Tras la lisis una elevada proporción de proteína permaneció en la fracción soluble (S). **B.** Tras la precipitación en presencia de sulfato de amonio al 35% de saturación, la proteína fue purificada por cromatografía, utilizando columnas de Heparina (H), MonoS (MS) y de nuevo Heparina para concentrar la muestra (HC). El resultado final de la purificación se muestra en el último carril (Polλ). A la izquierda de los geles se muestra la migración electroforética de una colección de marcadores de peso molecular (PM).

Para comprobar si las variantes de Polλ purificadas son activas y si responden como la variante *wild-type* a la presencia del grupo P en el extremo 5' del *gap*, se estudió su capacidad de polimerización en sustratos tipo molde/iniciador abierto y en *gaps* de 5 nucleótidos sin y con un grupo P en su extremo 5'. Como se observa en la [figura 71B](#) todas las variantes de Polλ estudiadas son activas y respondieron a la presencia del grupo P. A excepción del polimorfismo R487W, todas las variantes presentaron un comportamiento como el de Polλ WT. El polimorfismo de Polλ R487W, siendo activo y respondiendo también a la presencia del grupo P en el extremo 5' del *gap*, destacó por su menor actividad de polimerización en presencia de Mg^{2+} en este tipo de sustratos.

Como ya hemos mencionado, el mecanismo de polimerización de las DNA polimerasas implica la presencia de dos cationes divalentes en el centro activo del enzima, que coordinan los grupos fosfatos del nucleótido entrante asegurando así la correcta catálisis (T. a Steitz, 1999b). Durante la misma, las DNA polimerasas eucariotas utilizan preferentemente el Mg^{2+} como metal. La presencia de los iones Mn^{2+} durante la polimerización se ha visto asociada a unos parámetros de fidelidad de síntesis más reducidos (Beckman et al., 1985; Pelletier et al., 1996). Sin embargo, no se ha observado un aumento en los errores de inserción de Polλ en presencia de Mn^{2+} . De hecho, se ha propuesto que Polλ puede unirse con mayor afinidad a los iones Mn^{2+} que a los iones Mg^{2+} y por tanto podría estar adaptada para utilizar iones Mn^{2+} *in vivo* (Blanca et al., 2003). Análisis estructurales confirman la presencia de estos cationes divalentes en el centro activo del enzima (Garcia-Diaz et al., 2007).

Al sustituir los iones Mg^{2+} por los iones Mn^{2+} en la reacción observamos una estimulación de la síntesis, reflejada en la utilización de concentraciones de nucleótido mucho más reducidas. En presencia de Mn^{2+} las variantes de Polλ presentaron el mismo comportamiento que la Polλ WT. El

polimorfismo Polλ R487W vio además estimulada su actividad por Mn^{2+} , siendo en este caso menor la diferencia de actividad respecto a la Polλ WT que la mostrada en presencia de Mg^{2+} (**Figura 71C**).

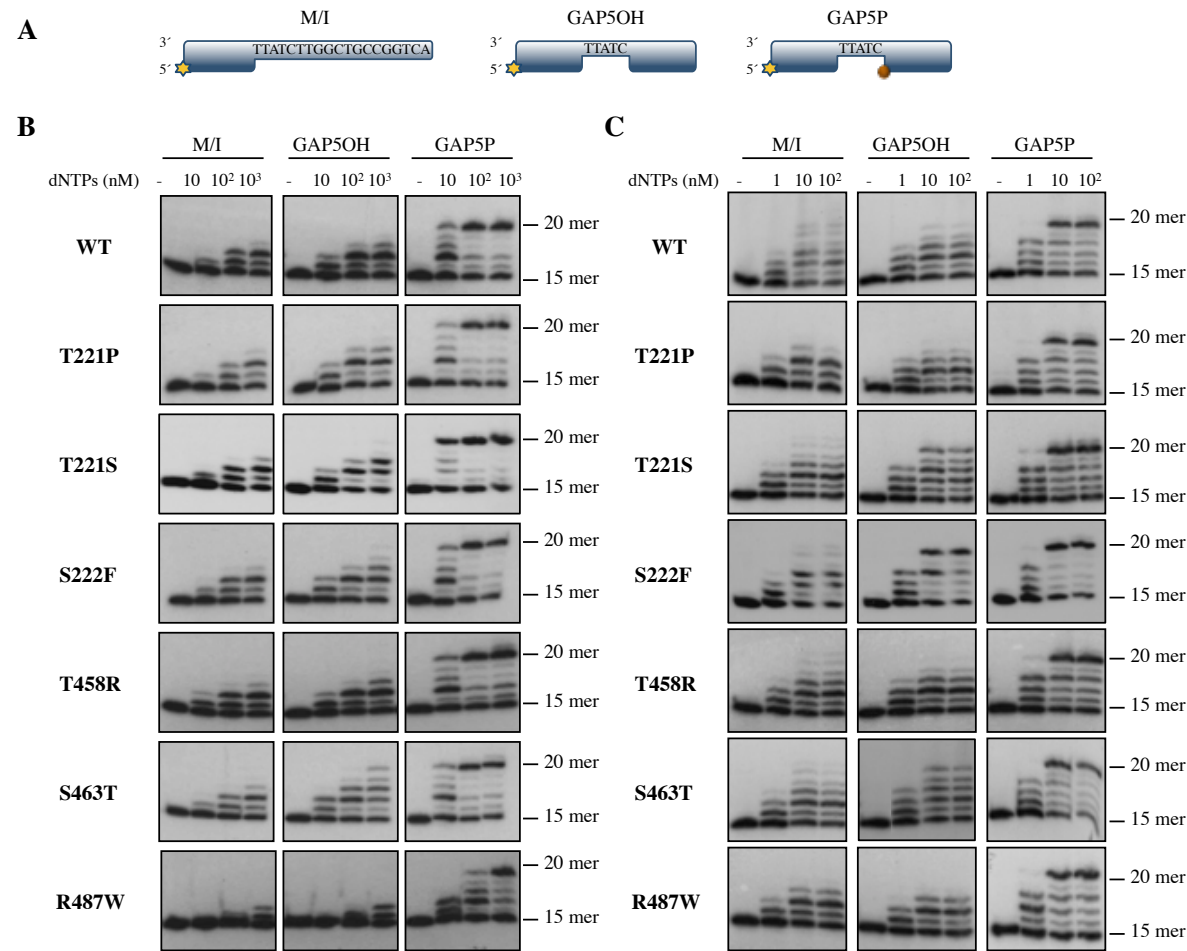


Figura 71. Actividad de las variantes de Polλ en diferentes sustratos. **A.** Los distintos sustratos empleados en el ensayo fueron un molde/iniciador (M/I), un sustrato *gap* de 5 nucleótidos sin el grupo fosfato en posición 5' (GAP5OH) y un sustrato *gap* de 5 nucleótidos con un grupo fosfato en posición 5' (GAP5P) representado por una esfera. Las reacciones se llevaron a cabo como se describe en Materiales y Métodos en presencia de 2,5 mM Mg^{2+} , 10 nM, 100 nM y 1000 nM dNTPs (**B**) y 1 mM Mn^{2+} y 1 nM, 10 nM y 100 nM dNTPs (**C**). En ambos casos las reacciones se incubaron a 30 °C durante 20 min y a una concentración de DNA polimerasa de 50 nM.

6.4 Capacidad de unión al DNA

Una vez comprobado que todas las proteínas de interés son activas y responden a la presencia del grupo 5'P quisimos analizar su capacidad de unión al DNA. Para ello, llevamos a cabo un ensayo de retraso en gel o EMSA, tal y como se describe en Materiales y Métodos, en un sustrato idóneo para Polλ (GAP1P). Previamente comprobamos que en este tipo de sustratos todas las variantes presentaron una actividad muy parecida, entre el 40% y el 50% de extensión (**Figura 72A**), excepto el polimorfismo R487W, que como se destacó anteriormente presentó una menor actividad. Cuando el DNA es un GAP1P, todas las proteínas ensayadas fueron capaces de generar, a bajas dosis de enzima, un complejo estable E:DNA, por lo que concluimos que su afinidad por el DNA es similar a la Polλ

WT (**Figura 72B**). Incluso el polimorfismo R487W, que con una menor actividad, no presentó alterada su capacidad de unión al DNA, por lo que no es ésta la causa de actividad deficiente. Las bandas que presentan un mayor retraso, marcadas con * pueden ser consecuencia de un evento de dimerización, que favoreciese la unión de dos moléculas de proteína por cada molécula de DNA. La formación de estos súper-complejos de retraso ocurrió con todas las proteínas a excepción del polimorfismo T458R (carriles 3 y 15), que requiere una concentración mayor de proteína para que se formen.

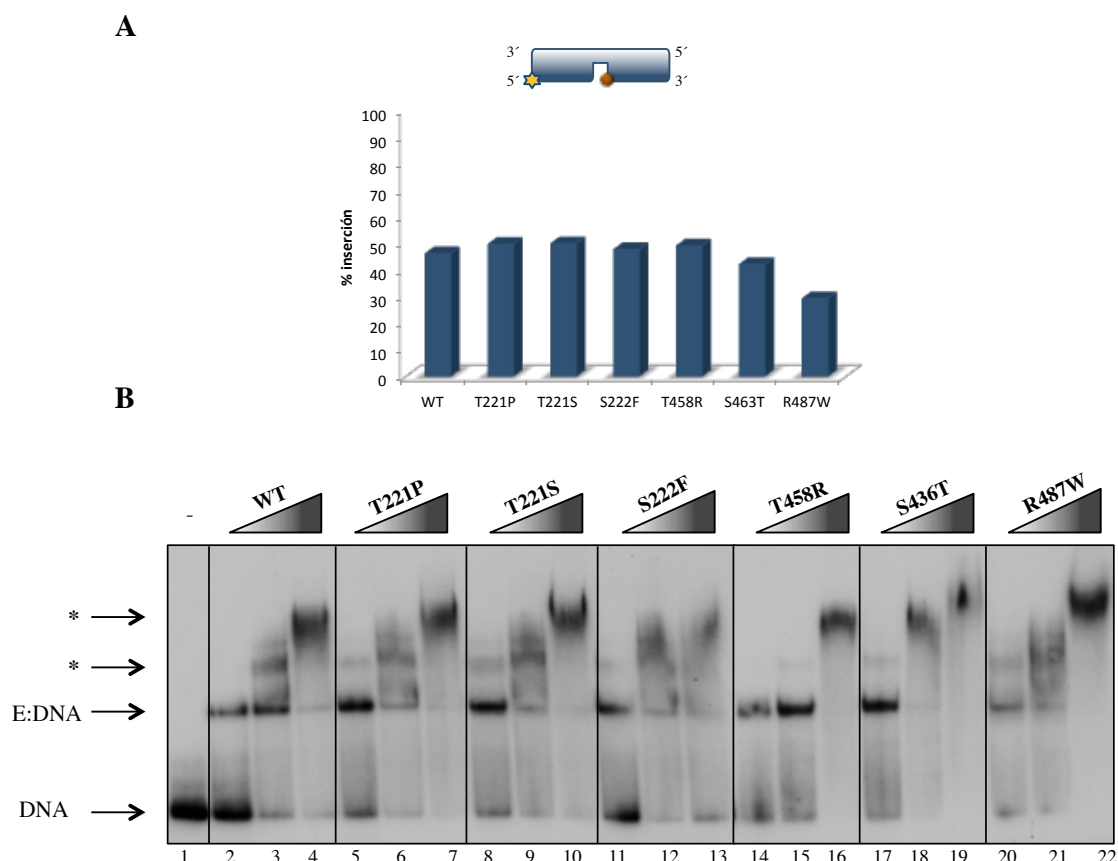


Figura 72. Las variantes de Polλ presentaron una unión estable en un GAP1P. **A.** Actividad de las variantes de Polλ en un GAP1P. La reacción se llevó a cabo como se describe en Materiales y Métodos, a 30 °C durante 10 min, a 10 nM ddGTP, en presencia de 2,5 mM Mg²⁺ y 50 nM DNA polimerasa. **B.** Unión de las variantes a un sustrato tipo GAP1P. Las reacciones se llevaron a cabo como se describe en Materiales y Métodos empleando el sustrato indicado, a 30 °C durante 15 min. Las dosis de DNA polimerasas fueron: 300 nM, 600 nM y 1,2 μM. Tras la electroforesis a 4 °C, los geles se secaron y se revelaron por autorradiografía.

6.5 Las variantes y polimorfismos simples de Polλ presentan actividad dRP liasa

Gracias a estudios de mutagénesis dirigida en la DNA Polβ se conocen los residuos del dominio de 8 kDa implicados en la actividad dRP liasa (Matsumoto et al., 1998; Prasad et al., 1998). Los residuos propuestos para esta actividad (His³⁴, Tyr³⁹, Lys⁶⁰, Lys⁶⁸, Glu⁷¹, Lys⁷² y Glu⁸⁴), no están presentes ni en Polμ ni en TdT, pero se encuentran conservados en Polλ (a excepción de la Lys⁶⁰). En

concreto, la Lys³¹² (Lys⁷² en Pol β) es la encargada de la formación de la base de Schiff durante la β -eliminación del residuo dRP. Se ha demostrado la capacidad de Pol λ de presentar actividad dRP liasa y su implicación en BER. (García-Díaz et al., 2000; García-Díaz et al., 2001; Braithwaite et al., 2005; Braithwaite et al., 2005b).

Para poder determinar si las variantes de Pol λ han visto afectada su actividad dRP liasa se empleó un sustrato de doble cadena de DNA con un U en posición 16 (Ver Materiales y Métodos). Tras marcar este sustrato en posición 3' se incubó en presencia de la uracil DNA glicosilasa humana (hUDG) y de la AP endonucleasa humana (hAPE1) para eliminar el uracilo y generar un sustrato con un residuo dRP respectivamente. Posteriormente se incubó este sustrato con la Pol λ WT y las variantes estudiadas tal y como se describe en Materiales y Métodos. Así pudimos concluir que todas las variantes conservan la capacidad de eliminar el residuo dRP como puede verse por la reducción del tamaño (mayor movilidad electroforética) del sustrato marcado (**Figura 73**).

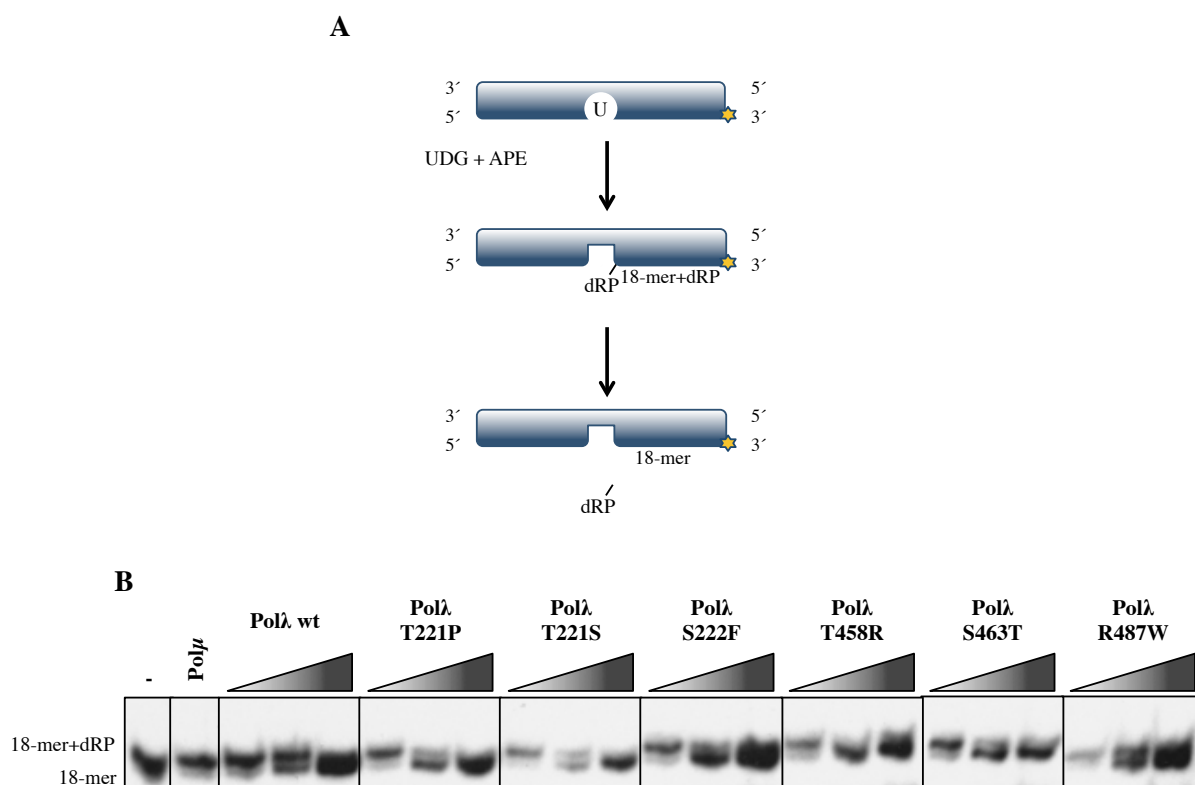


Figura 73. Actividad dRP liasa de las variantes de Pol λ . **A.** Representación esquemática de la reacción. El sustrato de doble cadena de DNA de 34 pb contiene un uracilo en posición 16 de la cadena marcada. Tras tratarlo con hUDG y hAPE se obtiene un sustrato con el grupo dRP que será eliminado gracias a la actividad dRP liasa de Pol λ . **B.** Resultado del experimento llevado a cabo como se describe en Materiales y Métodos durante 15 min, a 37 °C con una concentración de 100, 200 y 400 nM de cada una de las variantes de Pol λ y de 200 nM de Pol μ .

6.6 Fidelidad de las variantes y polimorfismos simples de Polλ

Una de las características más importantes de las DNA polimerasas es la fidelidad de copia durante el proceso de polimerización. Una alta tasa de error de síntesis de las polimerasas puede provocar alteraciones graves en la célula como pérdidas de información genética, muerte celular o cáncer. Polλ se caracteriza por presentar una tasa de error de sustitución de bases muy similar a Polβ (Bebenek et al., 2003). Para determinar si las variantes de Polλ T221P, T221S, S222F, T458R, S463T y R487W han visto afectada significativamente la fidelidad en sustrato tipo *gap* de un nucleótido con un grupo P en su extremo 5' (GAP1P), llevamos a cabo un ensayo de inserción *in vitro*. De esta manera pudimos comprobar que ninguna de las variantes presentó una alteración significativa en cuanto a fidelidad de inserción, ya que incorporaron frente a cada una de las bases molde el nucleótido correcto, obteniéndose así los pares de bases descritos por Watson y Crick (**Figura 74**).

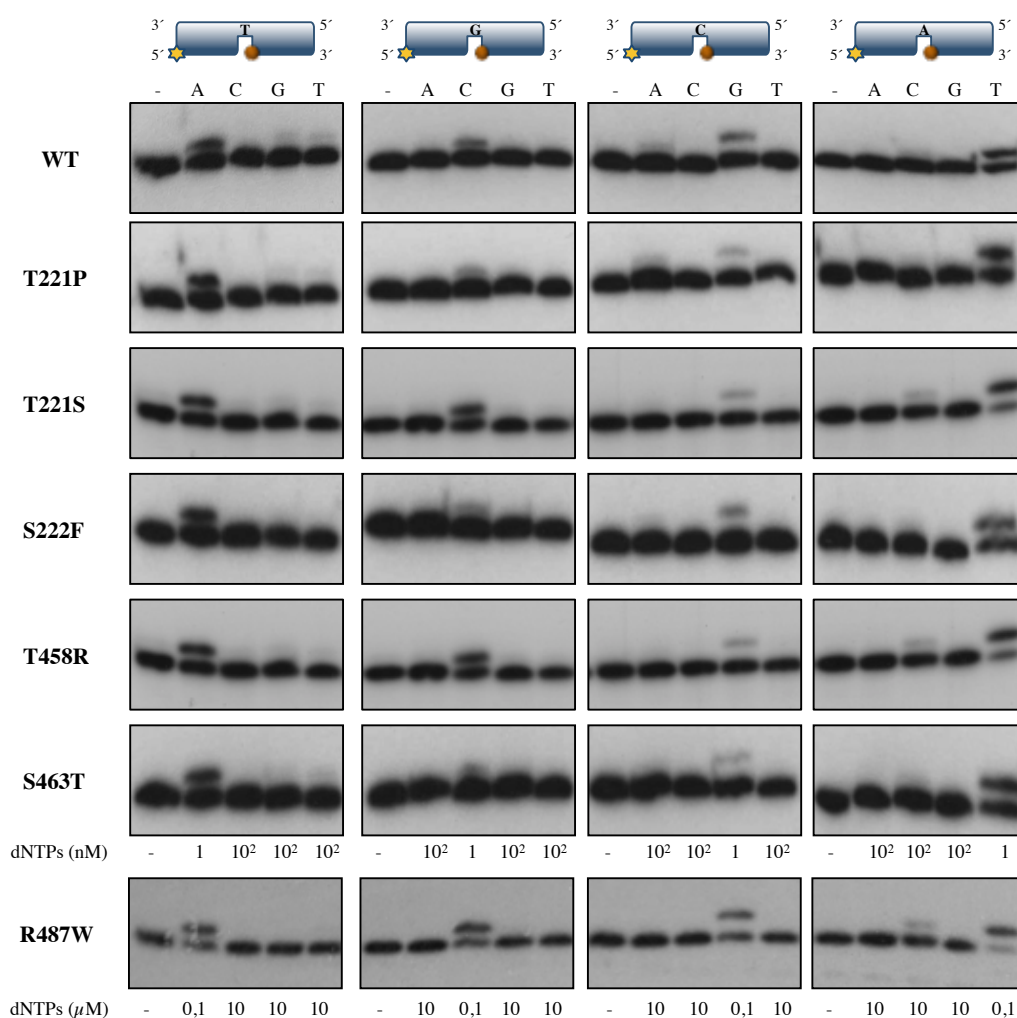


Figura 74. Fidelidad de las variantes de Polλ en un GAP1P. Los distintos sustratos empleados en el ensayo se muestran en la parte superior de la figura. Las reacciones se llevaron a cabo como se describe en Materiales y Métodos en presencia de 2,5 mM Mg²⁺, 50 nM DNA polimerasa y las concentraciones de dNTPs indicadas en cada caso. Las reacciones se incubaron a 30 °C durante 20 min.

En el caso de Polλ R487W las concentraciones de nucleótidos utilizadas en el ensayo son 100 veces mayores que para el resto de las variantes con el objetivo de corregir la menor actividad que presenta este polimorfismo. A pesar de esta menor actividad, no se vio afectada su fidelidad, observándose el mismo comportamiento que en el caso de Polλ WT.

6.7 Determinación de los parámetros cinéticos del polimorfismo R487W

De todas las variantes de interés de Polλ hemos visto que el polimorfismo R487W no presentó un comportamiento *wild-type* en sustratos tipo molde/iniciador y *gaps* de pequeño tamaño tanto sin grupo fosfato en su extremo 5' como con él (Figura 71). Al estudiar la capacidad de unión al DNA de este polimorfismo comprobamos que no se ve alterada, por lo que la menor actividad de esta variante no es debida a un defecto en la unión al DNA (Figura 72). Por esta razón, quisimos determinar sus parámetros cinéticos. Para ello llevamos a cabo reacciones en condiciones de estado estacionario en sustratos tipo GAP1P cuya base molde es cada una de las cuatro bases, dA, dC, dG y dT. Se valoró la incorporación del nucleótido complementario a cada una de las bases molde como se describe en Materiales y Métodos y se representó en función de la concentración de nucleótido empleada en cada caso. Los valores de V_{max} y K_m aparentes se obtuvieron del mejor ajuste a la ecuación de Michaelis-Menten y se determinaron los valores de eficiencia catalítica (K_{cat}/K_m) de ambas proteínas (Ver Materiales y Métodos). Como se observa en la tabla 5, los valores de las K_m aparentes para los diferentes dNTPs fueron mayores en el polimorfismo R487W, siendo de media 1,6 veces mayor que en el caso de Polλ WT. Destaca además que la V_{max} alcanzada por R487W fue de media 0,76 la V_{max} alcanzada por Polλ WT.

		K_m (nM ⁻¹)	V_{max} (nM min ⁻¹)	K_{cat} (min ⁻¹)	Ef (nM ⁻¹ / min ⁻¹)	K_m (R487W / Wt)	K_{cat} (R487W / Wt)	Ef (R487W / Wt)
dA	Wt	22,89	7,28	0,29	0,013	2,27	0,86	0,38
	R487W	51,94	6,28	0,25	0,048			
dC	Wt	22,98	6,57	0,26	0,011	1,55	0,73	0,48
	R487W	3,74	4,92	0,19	0,0055			
dG	Wt	10,66	7,2	0,29	0,027	1,36	0,76	0,55
	R487W	14,53	5,45	0,22	0,015			
dT	Wt	40,3	8,02	0,32	0,079	1,33	0,69	0,52
	R487W	53,77	5,58	0,22	0,04			

Tabla 5. Parámetros cinéticos del polimorfismo simple de Polλ R487W en moléculas tipo GAP1P. El ensayo se llevó cabo como se describe en Materiales y Métodos. Se detallan los parámetros de Polλ WT y del polimorfismo R487W así como la relación entre los mismos.

La K_{cat} definida como el número de recambio del enzima o el número de moléculas de sustrato recambiados por el enzima por unidad de tiempo, es una relación de la V_{max} y la concentración total de

enzima. Al ser menor la V_{\max} de R487W encontramos que su K_{cat} también disminuye; es decir, el polimorfismo simple R487W procesó menor número de moléculas de sustrato por unidad de tiempo que la variante más común. Por último, la eficiencia catalítica se define como la relación K_{cat}/K_m . De nuevo, al presentar estos dos parámetros cinéticos alterados, el polimorfismo R487W presentó una eficiencia enzimática media de 0,48 respecto a Polλ WT.

La alteración de los parámetros cinéticos de este polimorfismo podrían ser debidos a una distorsión local de la estructura que afecte a la zona catalítica de la polimerasa (ver apartado 6.10).

6.8 Síntesis a través de lesiones

6.8.1 Síntesis a través de lesiones: 5-Fluorouracilo (5-FU)

El 5-fluorouracilo (5-FU) es un derivado halogenado que se caracteriza por tener en el C-5 un átomo de flúor (**Figura 75**) Fue sintetizado por primera vez como agente antitumoral en la década de los 50 por Heidelberger y cols. (Heidelberger et al., 1957). Sus estudios se basaron en la observación de que en hepatomas de ratas la utilización del uracilo estaba alterada respecto a tejidos sanos, indicando que el metabolismo del uracilo podría ser una diana potencial de quimioterapia. En la actualidad el 5-FU es uno de los agentes antitumorales (solo o junto a otros fármacos) más utilizados en el tratamiento de diferentes tipo de cáncer como el cáncer de colon o cáncer de mama (Nita et al., 1998; Ohtsu et al., 2003).

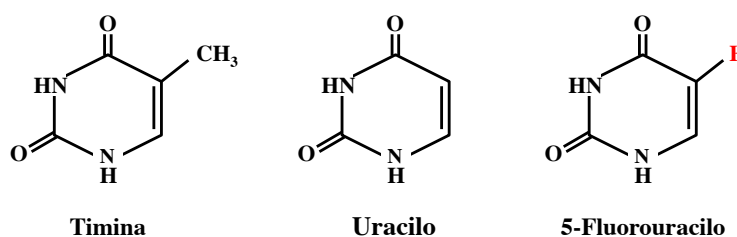


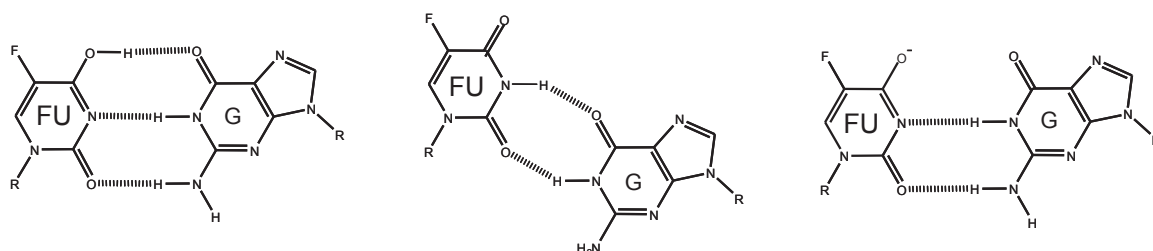
Figura 75. Estructura química de las bases Timinia, Uracilo y 5-fluorouracilo.

El 5-FU entra en la célula por la misma vía que las pirimidinas, donde es capaz de incorporarse a las rutas metabólicas. Así, el 5-Fu puede ser convertido en diferentes metabolitos activos: fluorodeoxiuridinamonofostato (5-FdUMP), fluorodeoxiuridinatrifostato (5-FdUTP) y fluorouridinatrifostato (FUTP). La timidilato sintasa (TS) cataliza la conversión de deoxiuridinamonofostato (dUMP) a deoxitimidinamonofostato (dTMP) con la reducción del folato como dador del grupo metilo. El 5-FdUMP es capaz de unirse a la TS formando un complejo ternario junto con el folato, provocando la inhibición del enzima y por tanto alterando la síntesis de dTMP.

(Santi et al. 1972). La alteración de los niveles de dTMP provoca a su vez la modificación de los niveles de dTTP y por tanto el desbalanceo del pool de desoxinucleótidos; afectando todo ello severamente la síntesis y reparación del DNA y llevando a daños letales en la célula. Además la inhibición de la TS provoca un aumento de los niveles de dUMP que puede ser convertido en dUTP y junto a 5-FdUTP ser incorporado en el DNA. Por su parte, el 5-FUTP al ser incorporado en el RNA, altera su normal funcionamiento y procesamiento (revisado por Longley et al., 2003; Wyatt et al., 2009).

Además de los efectos descritos anteriormente sobre la TS, el 5-FU provoca un efecto mutagénico por los apareamientos incorrectos que produce. El 5-FU es capaz de formar el par A:5-FU, que se ha visto es más estable que el par A:T por las propiedades del átomo de flúor (Coll et al., 1989; Habener et al., 1988). Sin embargo, el 5-FU también es capaz de formar el par G:5-FU por la fuerte electronegatividad del átomo de flúor que altera la densidad electrónica del anillo pirimidínico, (**Figura 76**) favoreciendo la formación de puentes de hidrógeno con residuos de guanina (Hopkins & Goodman, 1980). Como consecuencia, durante la replicación del DNA se producen transiciones del tipo A:T, a G:C.

A



B

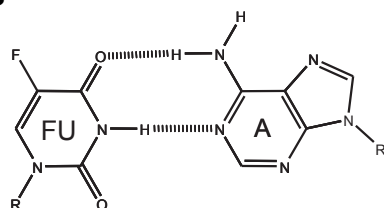


Figura 76. Apareamiento del 5-fluorouracilo con las bases Guanina y Adenina. A. Diferentes estructuras del par 5FU:G. **B.** Apareamiento del 5FU con A con una estructura del tipo *Watson-Crick*.

El estudio de la capacidad de incorporación del 5-FU en el DNA por parte de las DNA polimerasas Pol α y Pol β ha demostrado que ambas polimerasas son capaces de insertar 5-FdUTP de manera similar a dTTP (Tanaka et al. 1981). Estudios previos en nuestro laboratorio realizados por la Dra. Gloria Terrados mostraron que las DNA polimerasas de la Familia X, Pol β , Pol λ y Pol μ son capaces de tolerar la presencia de 5-FU en el DNA, insertando preferentemente dA, y de incorporar 5-FdUTP frente a dA siendo la inserción frente a dG detectable pero poco eficiente únicamente en el caso de Pol β y Pol μ . Por la importancia del 5-FU como agente antitumoral y por la diversidad en el

comportamiento de las DNA polimerasas de la Familia X, nos interesó estudiar la capacidad de las variantes de Polλ de tolerar este derivado halogenado.

6.8.1.1 Inserción frente a 5-FU

Para estudiar el comportamiento de las diferentes variantes de Polλ frente a 5-FU, llevamos a cabo un ensayo de polimerización en una molécula tipo molde/iniciador, siendo la primera base molde el 5-fluororacilo (5-FU) o sus controles dT y dU. Al suministrar cada uno de los ddNTPs por separado pudimos además analizar la fidelidad de la reacción. Usamos ddNTPs con la finalidad de observar únicamente la incorporación frente a la primera base molde, sin que puede haber una extensión mayor. Como se observa en la **figura 77**, todas las variantes presentaron el mismo comportamiento que Polλ WT, insertando el nucleótido correcto ddATP frente a las tres bases molde (dT, dU y 5-FU). En un contexto de reparación, como es el caso de un *gap* de un nucleótido con un grupo fosfato en su extremo 5', encontramos de nuevo que tanto Polλ como las variaciones simples analizadas, insertaron ddATP frente a los moldes dT, dU y 5-FU.

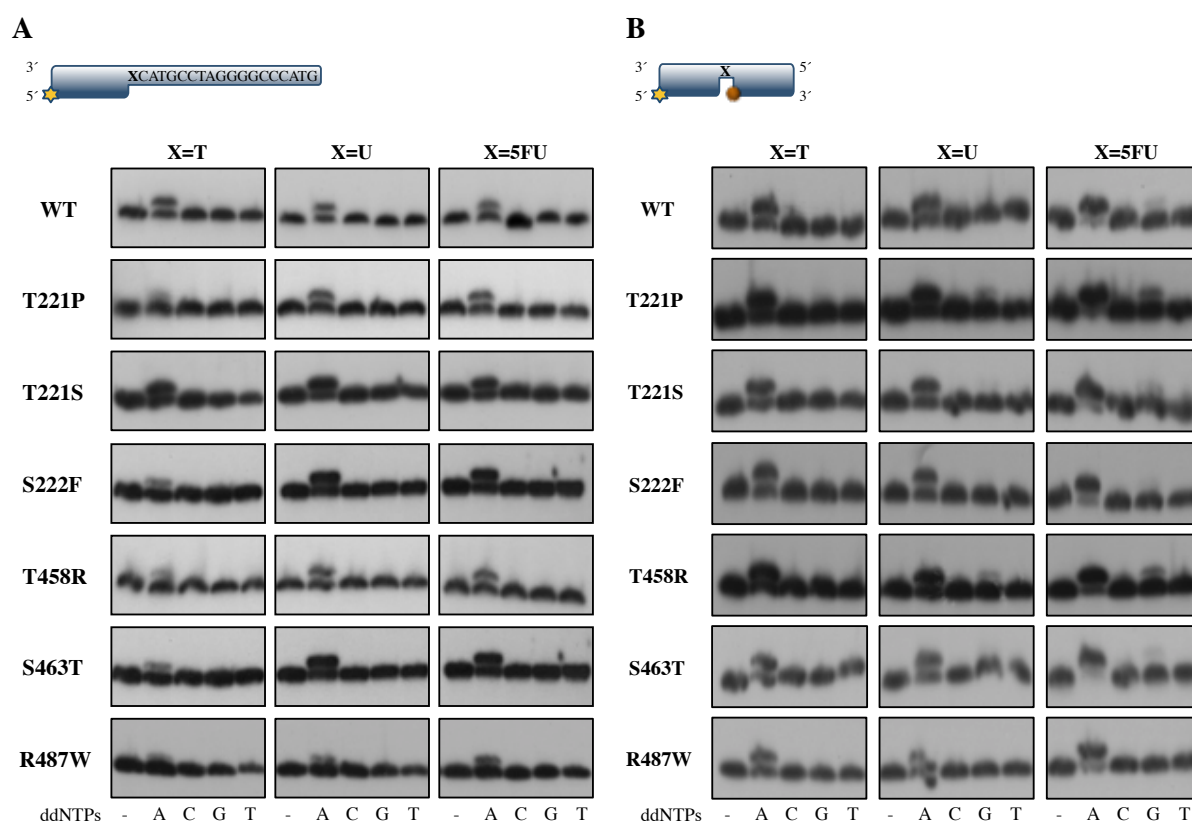


Figura 77. Las variantes de Polλ insertaron ddATP frente dT, dU y 5-FU. A. Inserción en un contexto molde/iniciador. El sustrato empleado se muestra en la parte superior. Las reacciones se llevaron a cabo como se describe en Materiales y Métodos en presencia de 2,5 mM Mg²⁺, 50 nM DNA polimerasa y 100 nM ddNTPs, salvo en el caso de R487W que fue 1 μM. **B.** Inserción en un contexto de GAP1P. El sustrato empleado se muestra en la parte superior. Las reacciones se llevaron a cabo como se describe en Materiales y Métodos en presencia de 2,5 mM Mg²⁺, 50 nM DNA polimerasa y 10 nM ddNTPs, salvo en el caso de R487W que fue 100 nM. Las reacciones se incubaron a 30 °C durante 20 min.

En estos ensayos observamos una mejor eficiencia de Pol λ y sus variantes a la hora de insertar ddATP frente a 5-FU que frente a dT y dU. Por ello quisimos, en este mismo contexto de reparación, analizar más en profundidad el comportamiento de todas las variantes y determinar cómo de fuerte es esta preferencia. Llevamos a cabo un ensayo de polimerización donde el único nucleótido suministrado fue ddATP a diferentes concentraciones. Como muestran las gráficas de la **figura 78**, todas las polimerasas analizadas insertaron mejor ddATP frente a 5-FU que frente a dT o dU. En todos los casos la inserción frente a dT y dU fue muy similar, ligeramente mayor frente a dT, con la excepción del polimorfismo Pol λ T458R que a mayor concentración de ddA, prefiere su inserción frente a dU que frente a dT. En la **tabla 6** se muestra la relación de inserción de ddATP frente a dU versus dU (U/T) y dT versus 5-FU (5-FU/T) de cada variante a una concentración dada de ddATP. Observamos que esta relación es de media de 0,85 en el caso de U/T y de 1,54 en el caso de 5-FU/T.

Polλ	U/T	5-FU/T
WT	0,79	1,49
T221P	0,75	1,42
T221S	0,92	1,3
S222F	0,97	1,81
T458R	0,85	1,48
S463T	0,87	1,65
R487W	0,80	1,66

Tabla 6. Relación de inserción de ddATP frente a dU versus dT y 5-FU versus dT. La relación se calculó con los porcentajes de inserción de ddATP a 10 nM para los diferentes moldes utilizados. La concentración de ddATP en la variante R487W fue de 100 nM.

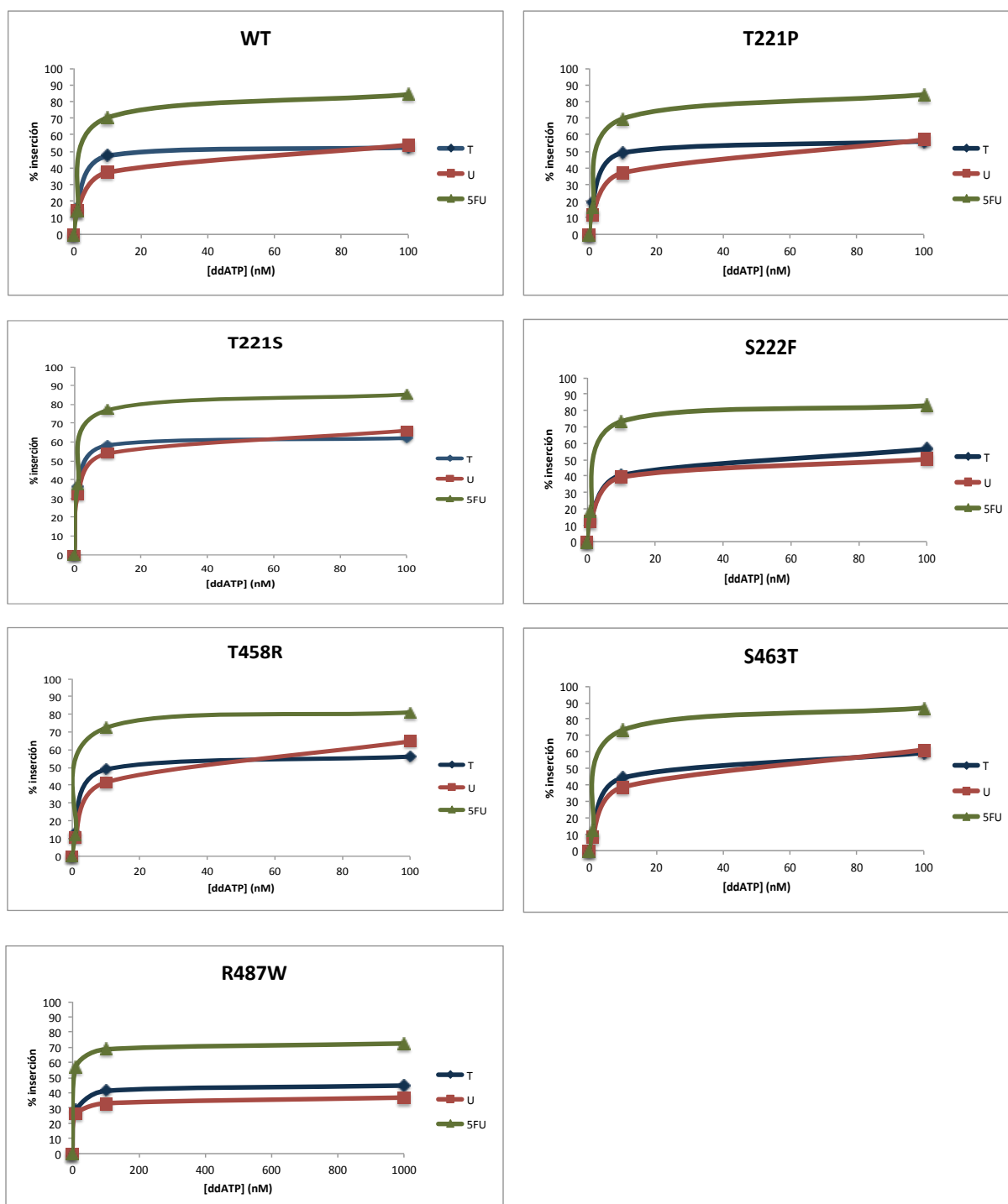


Figura 78. Polλ y sus variantes insertaron ddATP frente a 5-FU mejor que frente a dT o dU. El sustrato utilizado fue un GAP1P. Las reacciones se llevaron a cabo como se describe en Materiales y Métodos en presencia de 2,5 mM Mg^{2+} , 50 nM DNA polimerasa y a las concentraciones de ddATP indicadas en cada caso. Las reacciones se incubaron a 30 °C durante 20 min.

6.8.1.2 Inserción de 5-FdUTP en el DNA

Anteriormente hemos descrito la capacidad del 5-FU de entrar en la célula de la misma manera que el U e incorporarse tanto en el DNA como en el RNA, así como la capacidad de Pol λ de incorporar el 5-FdUTP en el DNA únicamente de forma “correcta” frente a dA. Para evaluar si las variantes polimórficas presentan un comportamiento diferente, llevamos a cabo un ensayo en un contexto de molde/iniciador donde la primera base del molde es dA o dG. La **figura 79** muestra como solo se produjo la inserción de 5-FdUTP cuando la base molde es dA, presentando la misma capacidad de incorporación que Pol λ WT. Ninguna de las proteínas ensayadas presentó un comportamiento mutagénico insertando 5-FdUTP frente a dG. Incluso el polimorfismo R487W presentó el mismo comportamiento, insertando de forma correcta 5-FdUTP frente a dA, a pesar de ser necesario aumentar la concentración de dNTPs en la reacción.

Este comportamiento libre de error de Pol λ y sus variantes reduce su protagonismo a la hora de usar el 5-FdUTP como agente antitumoral, al no insertarlo frente a las dos posibilidades en el DNA.

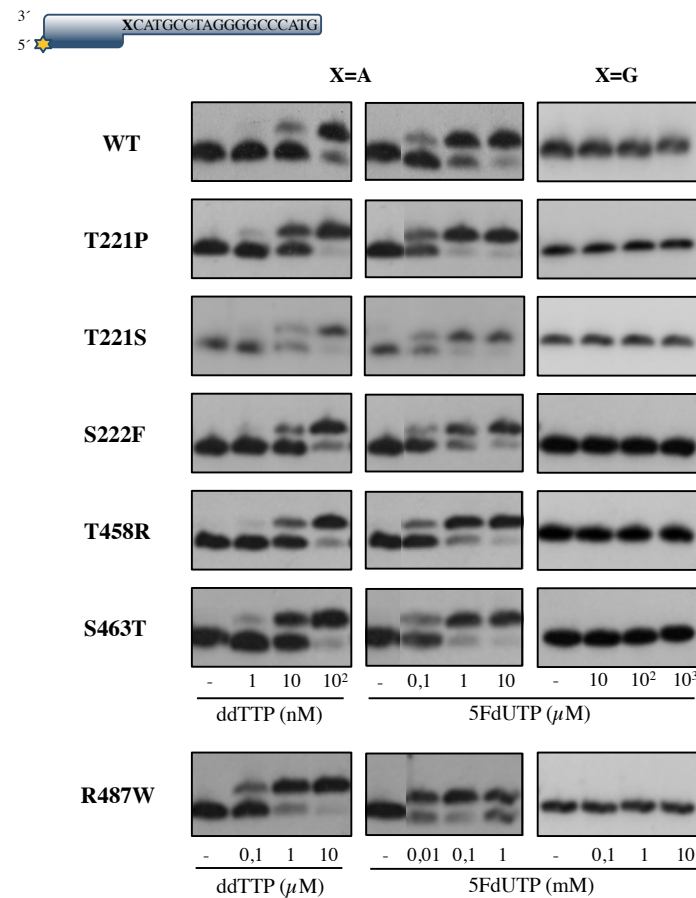


Figura 79. Las variantes de Pol λ solo son capaces de insertar 5-FdUTP frente a dA. El sustrato empleado en el ensayo fue un molde/iniciador cuya secuencia se muestra en la parte superior de la figura. Las reacciones se llevaron a cabo como se describe en Materiales y Métodos en presencia de 2,5 mM Mg²⁺, 50 nM DNA polimerasa y las concentraciones de ddTTP o 5-FdUTP indicadas en cada caso. Las reacciones se incubaron a 30 °C durante 20 min.

Polλ	T/5-FU
WT	10,01
T221P	10,1
T221S	9,94
S222F	12,72
T458R	11,03
S463T	13,12
R487W	58,83

Tabla 7. Relación de inserción de ddTTP versus 5-FdUTP frente a dA. La relación se calculó con los porcentajes de inserción de ddTTP a 10 nM y 5-FdUTP a 0,1 μ M teniendo en cuenta el factor de 10 en la concentración de los dNTPs. Para el polimorfismo R487W la relación se calculó con los porcentajes de inserción de ddTTP a 0,1 μ M y 5-FdUTP a 0,01 mM teniendo en cuenta el factor de 100 en la concentración de los dNTPs.

En la **tabla 7** se muestra la relación de inserción de dTTP versus 5-FdUTP frente a dA de cada una de las variantes a una concentración dada de nucleótido, siendo la media de todas de todas ellas de 17,96.

6.8.2 Síntesis a través de lesiones: 7,8-dihidro-8-oxoguanina (8oxoG)

Como hemos descrito en el capítulo 1, el estrés oxidativo al que la célula está continuamente expuesta provoca la aparición de bases modificadas en el DNA como la 7,8-dihidro-8-oxoguanina (8oxoG), así como la modificación del *pool* de desoxinucleótidos libres. La base modificada 8oxoG presenta dos conformaciones: en su conformación *anti* es capaz de aparear con la base dC; en la conformación *syn* facilita el apareamiento con la base dA, pudiendo dar lugar a mutaciones de transversión G:C a T:A (Moriya, 1993). Recordemos que Polλ incorpora tanto dATP como dCTP frente a la base molde 8oxoG (en una proporción 1:1) y es capaz de extender los pares formados 8oxoG:dA y 8oxoG:dC, siendo la extensión de este último par más eficiente que la del par no dañado G:C (Picher & Blanco, 2007).

La conformación *syn* del 8oxodGTP es la que está favorecida a pH fisiológico (Jang et al., 2002). Sin embargo, como hemos mencionado anteriormente, la inserción de 8oxodGTP frente a dA o dC en el DNA molde varía de unas polimerasas a otras incluso dentro de la misma familia. Tanto Polλ como Polβ prefieren incorporar 8oxodGTP frente a dA (Brown et al., 2007).

Por la abundancia de esta lesión en el DNA y por las propiedades de Polλ de tolerarla quisimos evaluar si las variantes objeto de estudio presentan el mismo comportamiento.

6.8.2.1 Inserción frente a 8oxoG

Para analizar la inserción frente a 8oxoG, llevamos a cabo un ensayo de polimerización del DNA en un sustrato tipo molde/iniciador siendo la primera base del molde 8oxoG o su control dG. En esta ocasión encontramos de nuevo un comportamiento WT de las variantes al ser capaces de insertar tanto dA como dC frente a 8oxoG (**Figura 80**). Realizando de nuevo este mismo ensayo en un contexto de reparación (GP1P) no observamos diferencia en el comportamiento ante la presencia de 8oxoG. En ambos contextos observamos una leve incorporación de dG. Esta incorporación es debida en el caso del sustrato molde/iniciador a que la segunda base del molde es una dC, por lo que las polimerasas pueden saltarse la primera base incorporando ddGTP frente a dC. En el caso del contexto de *gap* la cadena *downstream* puede ser desplazada, produciéndose de nuevo la incorporación de ddGTP frente a dC.

Pol λ se caracteriza por incorporar dATP y dCTP en una proporción 1:1 frente a 8oxoG. (Brown et al., 2007; Picher & Blanco, 2007). Tras determinar que las únicas inserciones de las variantes frente a 8oxoG eran las mismas que realiza Pol λ WT, quisimos estudiar si la relación de esta inserción era también 1:1. Para ello, evaluamos la reparación de un *gap*, suministrando tanto ddATP como ddCTP a diferentes concentraciones. Las gráficas de la **figura 81** muestran como todas las variantes ensayadas presentaron un comportamiento WT, insertando por igual ambos nucleótidos frente a 8oxoG. Solo T221S y T458R presentaron una preferencia mayor por ddATP sobre ddCTP a concentraciones elevadas. La **tabla 8** muestra la relación de la inserción de ddATP versus ddCTP a una concentración dada de nucleótido, siendo la media de todos ellos 0,97.

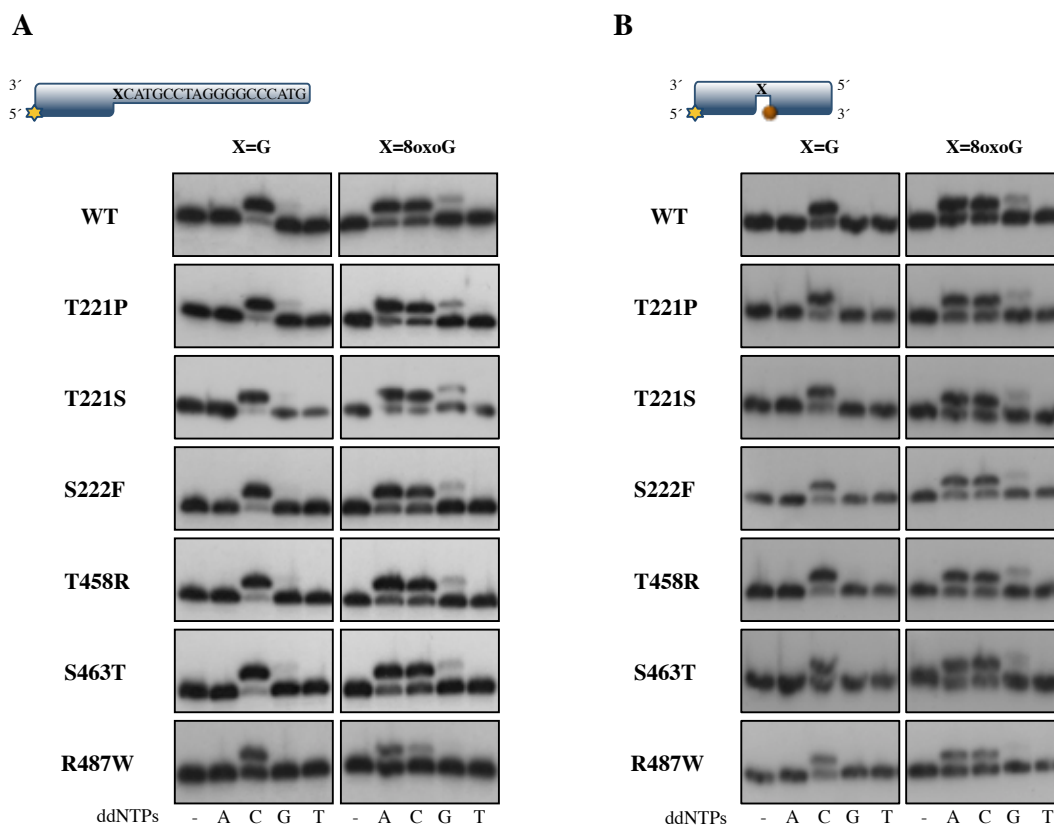


Figura 80. Las variantes de Polλ son capaces de tolerar la presencia de 8oxoG en el DNA. A. Inserción en un contexto molde/iniciador. El sustrato empleado se muestra en la parte superior. Las reacciones se llevaron a cabo como se describe en Materiales y Métodos en presencia de 2,5 mM Mg²⁺, 50 nM DNA polimerasa y 100 nM ddNTPs, salvo en el caso de R487W que fue 1 μM. **B.** Inserción en un contexto de GAP1P. El sustrato empleado se muestra en la parte superior. Las reacciones se llevaron a cabo como se describe en Materiales y Métodos en presencia de 2,5 mM Mg²⁺, 50 nM DNA polimerasa y 10 nM ddNTPs, salvo en el caso de R487W que fue 100 nM. Las reacciones se incubaron a 30 °C durante 20 min.

Polλ	C/A
WT	0,97
T221P	0,99
T221S	0,93
S222F	0,98
T458R	1
S463T	0,97
R487W	0,96

Tabla 8. Relación de inserción de ddCTP versus ddATP frente 8oxoG. La relación se calculó con los porcentajes de inserción de ddCTP y ddATP a 10 nM para los diferentes moldes utilizados. La concentración de ddATP en la variante R487W fue de 5 μM.

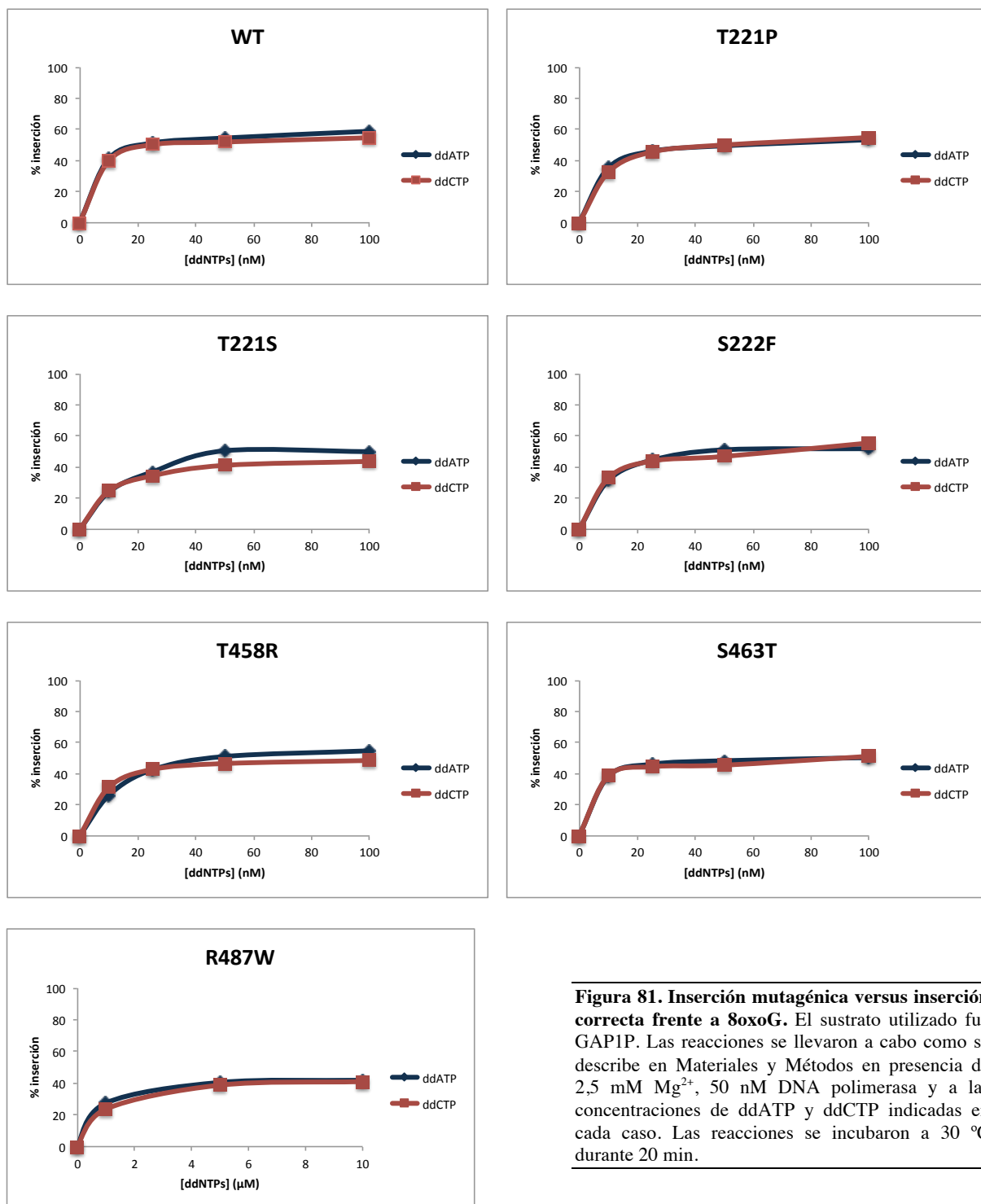


Figura 81. Inserción mutagénica versus inserción correcta frente a 8oxoG. El sustrato utilizado fue GAPIP. Las reacciones se llevaron a cabo como se describe en Materiales y Métodos en presencia de 2,5 mM Mg^{2+} , 50 nM DNA polimerasa y a las concentraciones de ddATP y ddCTP indicadas en cada caso. Las reacciones se incubaron a 30 °C durante 20 min.

6.8.2.2 Extensión de pares de bases con la base molde 8oxoG

El siguiente paso en la síntesis a través de lesiones es la extensión del nucleótido incorporado frente a la misma. La extensión es un paso crucial a la hora de la posible fijación de mutaciones en el DNA. Cuando frente a la base dañada se incorpora un nucleótido correcto interesa que la extensión de ese par formado sea lo más eficiente posible. Sin embargo, si el nucleótido frente a la base dañada no es el correcto, es importante que la extensión sea poco eficiente para que la célula pueda tener la oportunidad de corregir dicha lesión y que ésta no se traduzca en una mutación. Por este motivo, es importante saber la eficiencia de la extensión de los pares no mutagénico y de los mutagénicos frente a los pares correctos. En una situación de molde/iniciador Polλ extiende muy eficientemente el par no mutagénico 8oxoG:dC, incluso mejor que el par correcto dG:dC. Aunque el par mutagénico 8oxoG:dA también es capaz de ser extendido, la eficiencia en este caso es mucho menor (Picher & Blanco, 2007).

Para analizar la extensión de los pares formados tras la inserción frente a la base molde 8oxoG el contexto elegido ha sido un contexto de reparación, un GAP1P donde el par de bases del extremo del iniciador está formado por el par control dG:dC, por el par no mutagénico 8oxoG:dC o por el par mutagénico 8oxoG:dA. La base molde a copiar es en los tres casos dC. En este contexto, Polλ extendió de forma más eficiente el par correcto dG:dC. La eficiencia de la extensión de los pares dañados 8oxoG:dC y 8oxoG:dA fue muy similar y no muy distante de la del par correcto (**Figura 82**). Las variantes T221S, S222F y T458R extendieron los 3 pares estudiados con eficiencias muy parejas. Destaca el comportamiento del polimorfismo T221P, con una eficiencia en la extensión de los pares dG:dC y 8oxoG:dC comparable y superior a la del par 8oxoG:dA. Por su parte, el polimorfismo S463T presentó el comportamiento contrario, extendiendo con menor eficiencia el par correcto dG:dC y de forma muy similar los pares formados con la base dañada 8oxoG:dC y 8oxoG:dA. Por último, el comportamiento del polimorfismo R487W es de nuevo llamativo al presentar su mayor eficiencia de extensión con el par mutagénico 8oxoG:dA y la menor con el par correcto dG:dC (**Figura 82**).

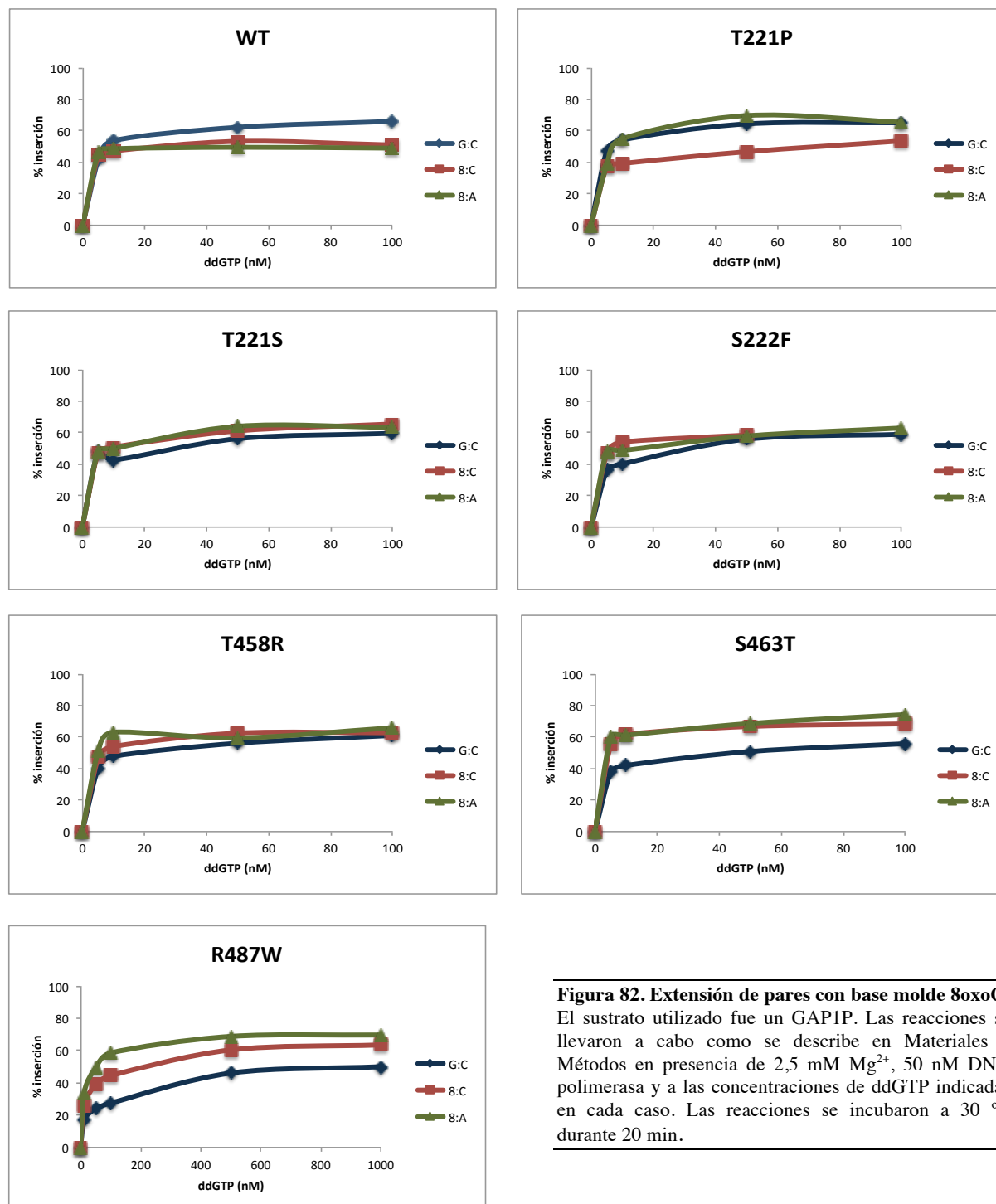


Figura 82. Extensión de pares con base molde 8oxoG. El sustrato utilizado fue un GAP1P. Las reacciones se llevaron a cabo como se describe en Materiales y Métodos en presencia de 2,5 mM Mg^{2+} , 50 nM DNA polimerasa y a las concentraciones de ddGTP indicadas en cada caso. Las reacciones se incubaron a 30 °C durante 20 min.

6.8.2.3 Inserción de 8oxodGTP en el DNA

Para estudiar la inserción de 8oxodGTP en el DNA realizamos un ensayo en un contexto de reparación (GAP1P) siendo la base molde dC o dA y concentraciones crecientes de los desoxinucleótidos correctos (dGTP y dTTP respectivamente) y 8oxodGTP. Observamos que en todos los casos la inserción de la base modificada fue mejor frente a dA que frente a dC, como ha sido

descrito para la Polλ WT (Brown et al., 2007). Llama la atención que la eficiencia de inserción no es igual en todos los casos (**Figura 83**). Las variantes T221P, T221S y S463T presentaron una eficiencia muy similar a Polλ WT. La incorporación por parte de S222F fue ligeramente inferior. Cabe también destacar que la variante T458R fue capaz de llevar a cabo la incorporación de 8oxodGTP frente a dA, pero no frente a dC, lo que le convierte en un polimorfismo más mutagénico.

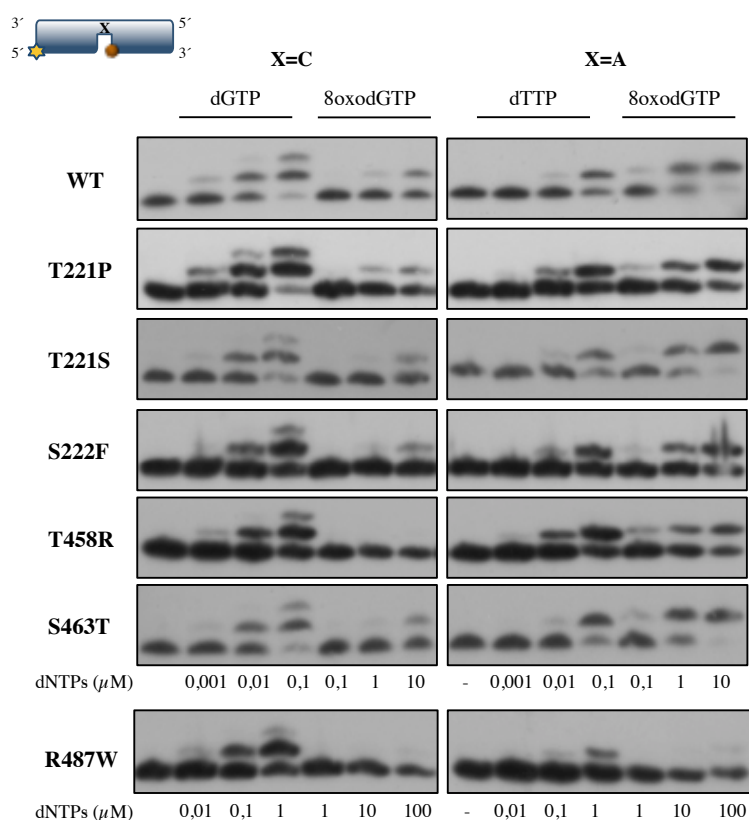


Figura 83. Inserción de 8oxodGTP de las variantes de Polλ frente a dC y dA. El sustrato empleado se muestra en la parte superior. Las reacciones se llevaron a cabo como se describe en Materiales y Métodos en presencia de 2,5 mM Mg^{2+} y 50 nM DNA polimerasa. La concentración de los diferentes dNTPs se indica en cada caso. Las reacciones se incubaron a 30 °C durante 20 min.

Si comparamos la capacidad de cada variante de insertar frente a dC bien el nucleótido correcto dGTP o bien 8oxodGTP encontramos que cuando se produce la inserción de ambos (Polλ WT, T221P, T221S, S222F y S463T), la inserción de dGTP fue mucho más eficiente que la inserción de 8oxodGTP, siendo de media $1,48 \cdot 10^3$ veces más eficiente (**Tabla 9**). Esto sugiere que tanto Polλ WT como sus variantes discriminaron muy eficazmente las bases dGTP y 8oxodGTP, bajando la probabilidad de insertar la base dañada en el DNA frente a dC. Sin embargo, en el caso de la inserción frente a dA la discriminación entre ddTTP y 8oxodGTP fue mucho menor. Tanto Polλ WT como su variantes insertaron ddTTP solo 11,5 veces mejor que 8oxodGTP, por lo que la probabilidad de insertar la base dañada es mayor cuando la base molde es dA. Mención a parte merece el

polimorfismo R487W ya que apenas es capaz de incorporar 8oxodGTP frente a ninguna de las dos bases molde. Esto puede ser debido a su menor afinidad por el nucleótido y a su vez ser una ventaja al no incorporar bases dañadas en el DNA.

	X=C	X=A
Polλ	G/8	T/8
WT	1,3.10 ³	9,5
T221P	1,6.10 ³	8,5
T221S	1,4.10 ³	10,5
S222F	1,6.10 ³	13,8
T458R	-	16,2
S463T	1,5.10 ³	10,7

Tabla 9. Relación de inserción de ddGTP versus 8oxodGTP frente a dC y ddTTP versus 8oxodGTP frente a dA. Para la inserción frente a dC (columna del centro) la relación se calculó con los porcentajes de inserción de ddGTP a 0,01 μ M y 8oxodGTP a 10 μ M teniendo en cuenta el factor de 1000 en la concentración de los dNTPs. Para la inserción frente a dA (columna de la derecha) la relación se calculó con los porcentajes de inserción de ddTTP a 0,1 μ M y 8oxodGTP a 1 μ M teniendo en cuenta el factor de 10 en la concentración de los dNTPs.

6.9 Implicación de las variantes de Polλ en el mecanismo de reparación de NHEJ

6.9.1 Actividad en función de la complementariedad de bases

Como hemos estudiado durante el capítulo 1, Polλ requiere que los extremos protuberantes producidos durante las roturas de doble cadena del DNA sean complementarios. Cuanto mayor es el número de bases apareados en la sinapsis, mayor es la eficiencia de la reacción. Quisimos comprobar si las variantes de Polλ se comportan de igual modo en un contexto de reparación de roturas de doble cadena mediante el mecanismo de NHEJ. Para ello, llevamos a cabo reacciones con extremos de DNA que presentaban una conectividad óptima para esta polimerasa: 3 y 4 pares de bases. A su vez, nos preguntamos si las variantes presentarían también diferente comportamiento en este tipo de reacciones en función del metal presente en la reacción. La **figura 84** muestra el diferente comportamiento de las variantes estudiadas en este proceso. Así, es digno de destacar que cuando la sinapsis es de 3 pb, la eficiencia de las variantes fue menor que la de Polλ WT, cuando el metal presente en la reacción es Mg²⁺ (**Figura 84A** paneles de la izquierda). Al sustituir estos iones por iones Mn²⁺ la eficiencia en este tipo de reacción mejoró, llegando incluso a ser algunas de ellas más eficientes (S222F y S463T) que Polλ WT (**Figura 84A** paneles de la derecha). Por otra parte, las variantes T221S y R487W apenas fueron capaces de completar esta reacción, independientemente del metal utilizado.

Al aumentar el número de bases que forman la sinapsis, observamos que las diferentes polimerasas ensayadas presentaron un comportamiento más cercano a Polλ WT a excepción de la variante S222F, que pudo completar la reacción a menores concentraciones de nucleótido que Polλ WT y el polimorfismo R487W, cuya actividad fue de nuevo indetectable en presencia de Mg²⁺.

(Figura 84B paneles de la izquierda) Sin embargo, pudimos recuperar la actividad de este polimorfismo en presencia de iones Mn^{2+} , con un comportamiento muy cercano al del Polλ WT. (Figura 84B paneles de la derecha).

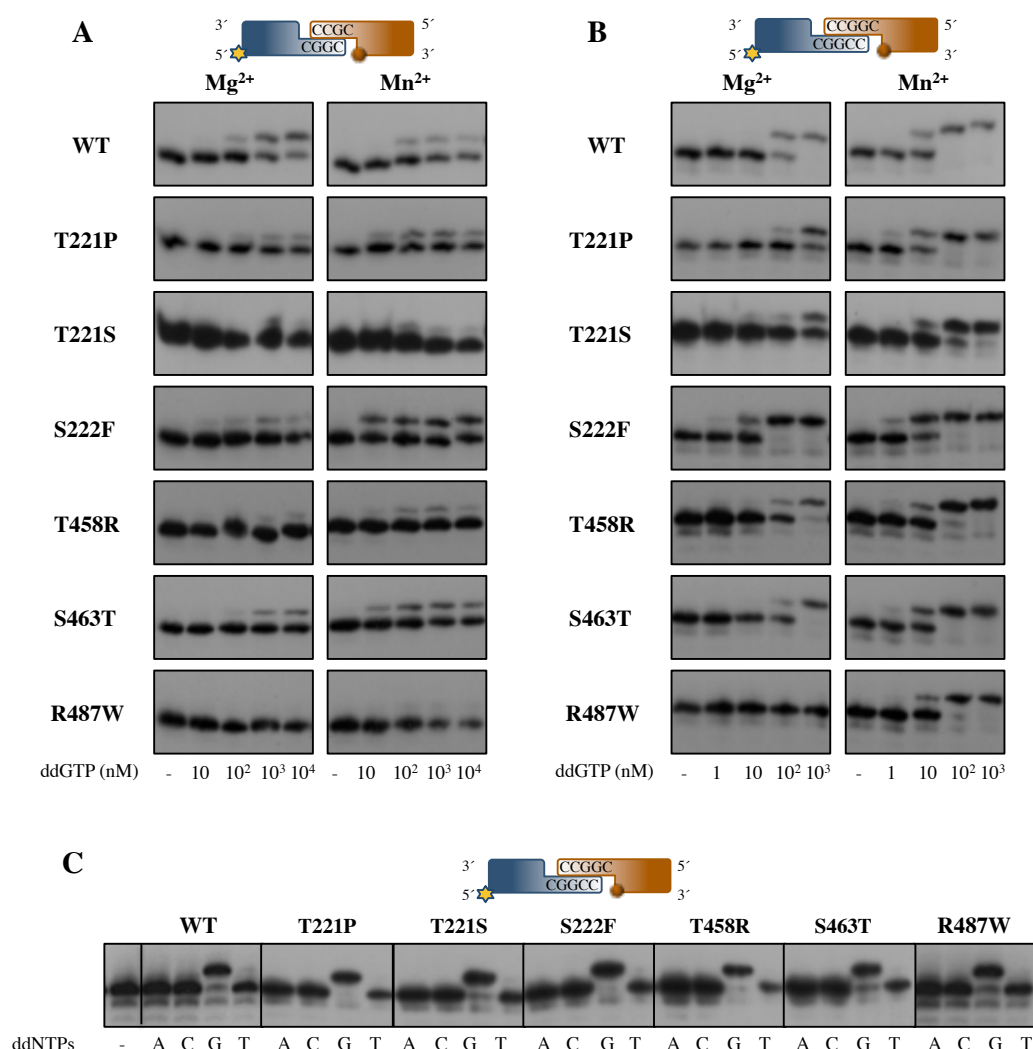


Figura 84. Actividad de NHEJ de las variantes de Polλ. **A.** Actividad de NHEJ en extremos complementarios de 3pb. **B.** Actividad de NHEJ en extremos complementarios de 4 pb. El sustrato marcado (azul) está formado por hibridación del oligonucleótido D3 con D1 (**A**) y D3+C con D1 (**B**) y el sustrato no marcado (naranja) por hibridación de D4-C con D2 (**A**) y D4-GC con D2 (**B**). La esfera naranja indica la presencia del grupo 5'P en la cadena *downstream* del sustrato. En ambos casos las reacciones se llevaron a cabo como se describe en Materiales y Métodos, a 30 °C, 1h y 500 nM DNA polimerasa en presencia de 2,5 mM Mg²⁺ o 0,1 mM Mn²⁺. Las concentraciones de ddGTP se indican en cada caso. **C.** Fidelidad de inserción en NHEJ de las variantes de Polλ en extremos complementarios de 4 pb. Los sustratos utilizados son los mismos que en B. Las reacciones se llevaron a cabo como se describe en Materiales y Métodos, a 30 °C, 1 h, 500 nM DNA polimerasa en presencia 0,1 mM Mn²⁺ y a 100 nM ddNTPs.

6.9.2 Fidelidad de las reacciones de NHEJ

En el apartado anterior hemos visto que todas las variantes de Polλ son capaces de reparar roturas de doble cadena en el DNA cuando las condiciones son las idóneas. Cuando se produce una

rotura en el DNA es importante que sea reparada pero la fidelidad de la reacción de reparación es su vez importante para evitar mutaciones que puedan ser dañinas para la célula. Por ello, como se muestra en la **figura 84C**, llevamos a cabo un ensayo de fidelidad en un contexto de NHEJ donde se suministran los dNTPs de manera independiente. Así, observamos que tanto Pol λ como sus variantes y polimorfismos simples incorporan preferentemente el nucleótido correcto (ddGTP) frente a la base molde dC.

6.10 Estructura de las variantes de Pol λ

Las estructuras cristalográficas de las proteínas nos proveen de valiosa información para entender sus funciones y mecanismos moleculares. En la última década han sido muchas las estructuras de Pol λ resueltas. Para poder comprender mejor los comportamientos de las variantes estudiadas, quisimos ahondar en la alteración estructural que estos cambios podrían provocar. Sin embargo, las estructuras de Pol λ disponibles en la base datos Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) son únicamente del *core* tipo Pol β . Hasta la fecha no se ha conseguido una estructura de Pol λ completa. Sí se dispone de la estructura del dominio BRCT de Pol λ (PDB id 2JW5), que comprende desde el aminoácido G30 al P135. Por estas razones, las variantes que se encuentran en la región Ser-Pro (T221P, T221S y S222F) no ha podido ser estudiadas, mientras que sí hemos podido profundizar en los aspectos estructurales de aquellas que se encuentran en la región del *core* tipo Pol β , (T458R, S463T y R487W). El estudio estructural se ha llevado a cabo con el programa MacPyMol, modelando las mutaciones en los residuos de interés en la estructura de Pol λ en complejo con el DNA molde y el nucleótido entrante (PDB id 1XSN).

El aminoácido T458 se encuentra en la lámina $\beta 3$ del subdominio *palma*. Este residuo establece contactos con los aminoácidos D459 (misma lámina $\beta 3$) y con el V476 (lámina $\beta 4$) a través de sus cadena laterales. En el polimorfismo T458R estas interacciones se ven alteradas. El aminoácido Arg deja de interaccionar con el residuo D459 y solo establece un contacto con el V476 (**Figura 85**). Entre las láminas $\beta 3$ y $\beta 4$ se encuentra el Loop 1 de Pol λ que cambia de conformación en complejo binario y ternario (PDB id 1XLS y 1XSN; ver capítulo 1). En los diferentes ensayos realizados a lo largo de este capítulo, el polimorfismo T458R presentó un comportamiento diferente a la Pol λ WT en la inserción de 8oxodGTP libre y en reparación de roturas de doble cadena por NHEJ cuando la sinapsis es de 3pb. Estos resultados pueden ser explicados por la alteración local de la estructura de la proteína en esta región.

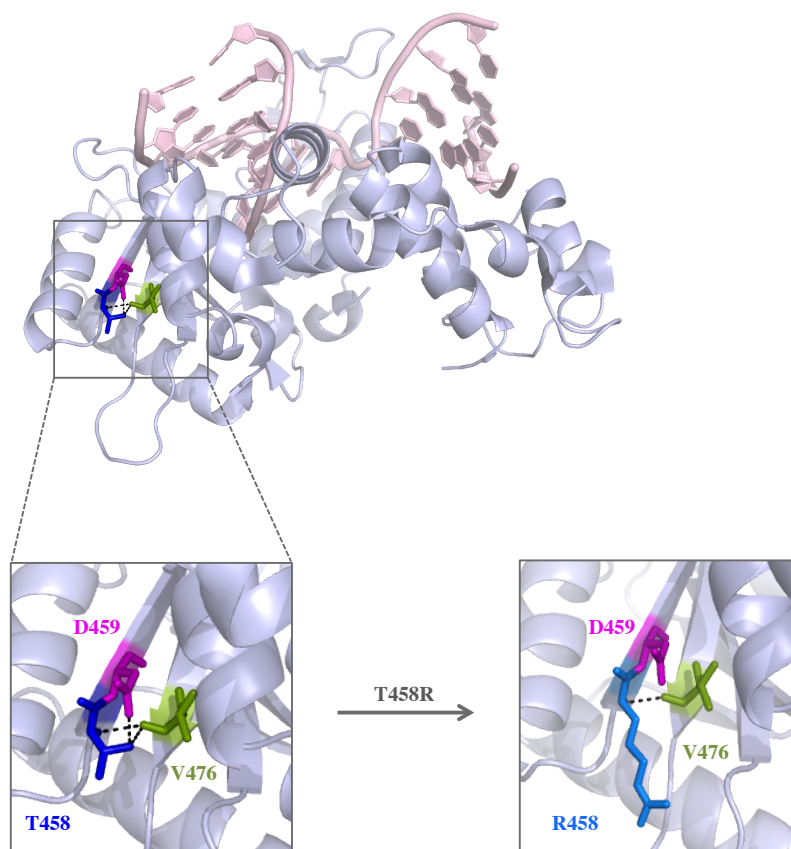


Figura 85. Modelo estructural del polimorfismo simple de Polλ T458R (PDB id 1XSN). Representación en *cartoon* del complejo ternario de Polλ. El DNA se muestra en rosa claro. Los residuos de interés se muestran en *sticks*. El residuo T458 en azul oscuro y se detallan sus contactos con los residuos V476 (verde) y D459 (morado). La mutación a R458 se detalla en la parte inferior derecha de la figura. Se indica el nuevo residuo en *sticks* en azul claro y se detallan sus contactos.

El aminoácido S463 se encuentra al inicio del Loop 1 de Polλ mencionado anteriormente. En complejo ternario (PDB id 1XSN), interacciona con los residuos E465 y Q470 y con la base del DNA molde en posición T₄. El cambio de Ser a Thr (S463T) no altera las interacciones de este residuo. (**Figura 86**). En los estudios realizados, la variante S463T presentó un comportamiento muy similar a Polλ WT excepto en la extensión de pares de bases dañadas 8oxoG:dC y 8oxoG:dA. Recordemos que el par que peor extendió fue el correcto (dG:dC), al contrario que Polλ WT. El aparente mantenimiento de la estructura local en esta región de Polλ explicaría el comportamiento de S463T, tan similar a Polλ. Sin embargo, una pequeña distorsión del Loop 1 podría afectar a la preferencia en la extensión de bases dañadas, provocando un aumento de la infidelidad de este polimorfismo. Esta hipótesis estaría respaldada por los estudios que revelan que la alteración del Loop 1 de Polλ provoca una disminución de su fidelidad (Bebenek et al., 2010).

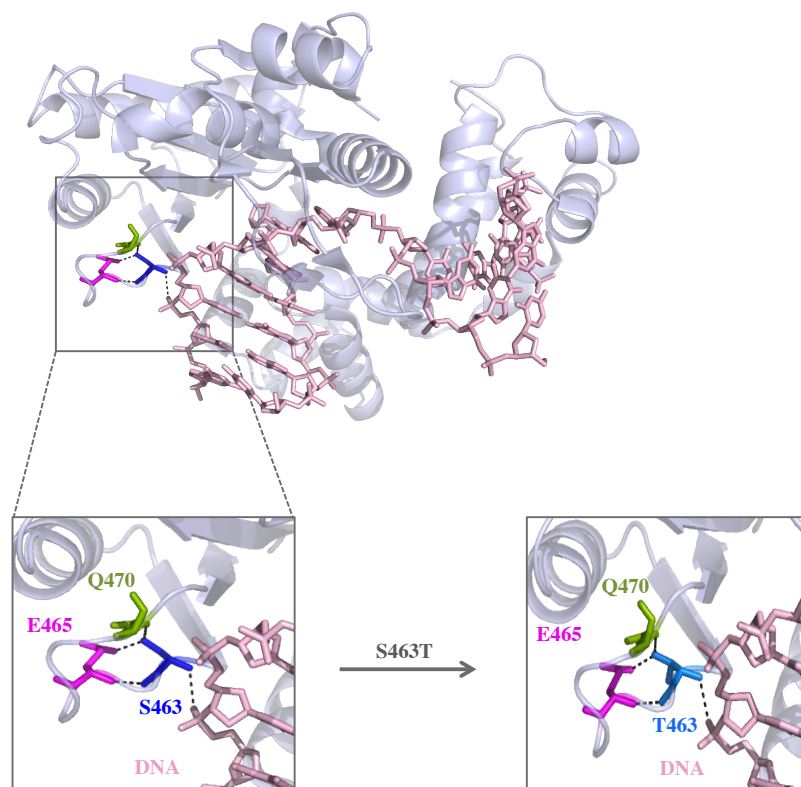


Figura 86. Modelo estructural del polimorfismo simple de Polλ S463T (PDB id 1XSN). Representación en *cartoon* del complejo ternario de Polλ. El DNA se muestra en *sticks*, en rosa claro. Los residuos de interés se muestran en *sticks*. El residuo S463 en azul oscuro y se detallan sus contactos con los residuos Q470 (verde), E465 (morado) y con el DNA. La mutación a T463 se detalla en la parte inferior derecha de la figura. Se indica el nuevo residuo en *sticks* en azul claro y se detallan sus contactos.

Por último, el aminoácido R487 se localiza al inicio de la lámina β5. Los residuos con los que contacta son la C477 de la lámina β4 y el E391 de la α-hélice J. En el polimorfismo R487W, se produce un cambio de un aminoácido básico a uno hidrofóbico y aromático, cuyas interacciones con los residuos C477 y E391 cambian (**Figura 87**). Además, cabe destacar que el aminoácido R487 se encuentra en la misma lámina β que el aspártico catalítico D490. Éste interacciona con los residuos V428 y V430 que flanquean los otros dos aspárticos catalíticos, D427 y D429 tal y como muestra la **figura 88**. La alteración local que puede ocurrir en la lámina β5 como consecuencia del cambio de Arg a Trp, podría alterar la perfecta arquitectura de las láminas β de la *palma*, haciendo que los aspárticos catalíticos no estén correctamente orientados. Esta alteración estructural explicaría la diferencia en las constantes catalíticas del polimorfismo R487W.

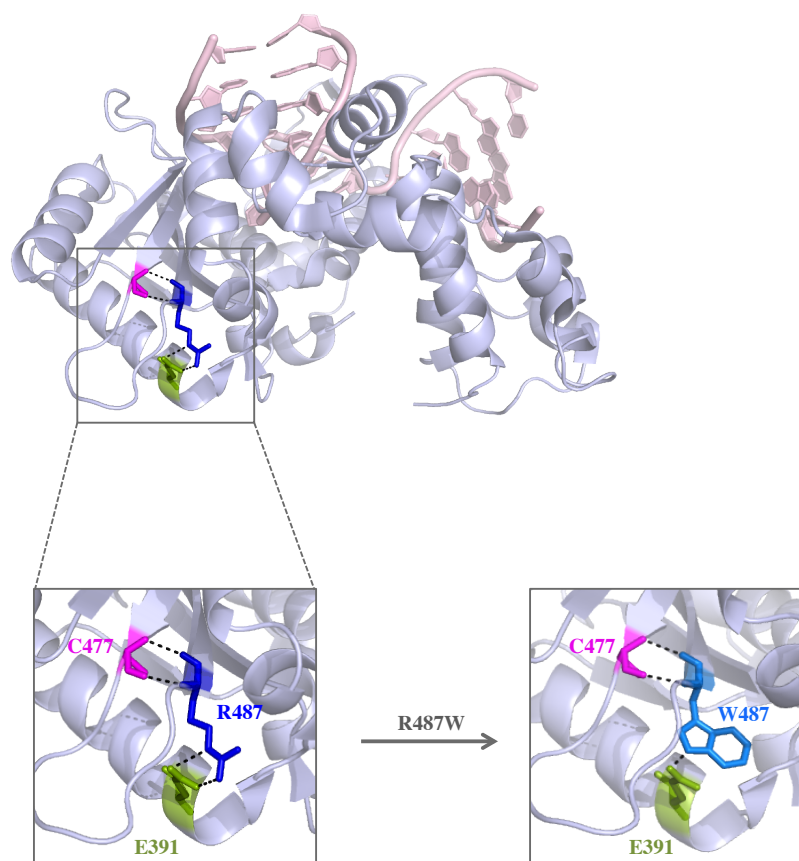


Figura 87. Modelo estructural del polimorfismo simple de Polλ R487W (PDB id 1XSN). Representación en *cartoon* del complejo ternario de Polλ. El DNA se muestra en rosa claro. Los residuos de interés se muestran en *sticks*. El residuo R487 en azul oscuro y se detallan sus contactos con los residuos E391 (verde) y C477 (morado). La mutación a W487 se detalla en la parte inferior derecha de la figura. Se indica el nuevo residuo en *sticks* en azul claro y se detallan sus contactos.

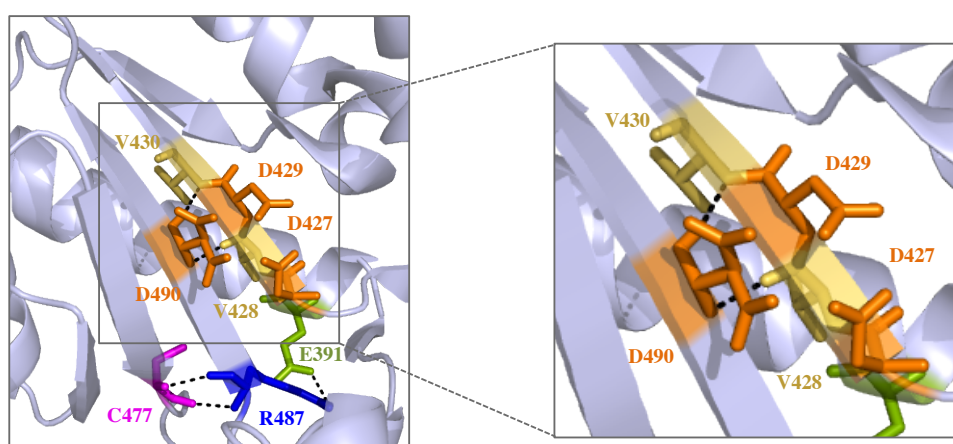


Figura 88. Detalle del modelo estructural del polimorfismo simple de Polλ R487W (PDB id 1XSN). Representación en *cartoon* del dominio *palma* de Polλ. Los residuos de interés se muestran en *sticks*. El residuo R487 en azul oscuro y se detallan sus contactos con los residuos E391 (verde) y C477 (morado). Se muestran además en *sticks* y en naranja los aspárticos catalíticos D427, D429 y D490. Se detallan en la parte derecha de la figura los contactos del residuo D490 con los residuos V428 y V430.

DISCUSIÓN

1. Filogenia de las DNA polimerasas de la Familia X

La presencia de DNA polimerasas de la Familia X ha sido descrita en *Eukaria*, *Bacteria*, *Archea* y virus con DNA como genoma. Al contrario de lo que ocurre en procariotas, virus y levaduras, en eucariotas superiores se ha descrito más de un miembro de la Familia X. Sin embargo, llama la atención que organismos modelo como *Caenorhabditis elegans* y *Drosophila melanogaster* carecen de polimerasas de esta familia. La gran conservación a nivel de estructura primaria y tridimensional, hace pensar en un ancestro común. Las relaciones filogenéticas entre los miembros conocidos de esta familia sugiere que se pueden agrupar en 5 subfamilias (Pol β , Tyr. Pol β , Pol λ , Po μ y TdT) que provienen de un ancestro común (Figura 89). La evolución en organismos superiores determina la pluralidad y especialización de los miembros de esta familia, con el fin de aumentar la eficiencia de los diferentes mecanismos de reparación del DNA en los que intervienen.

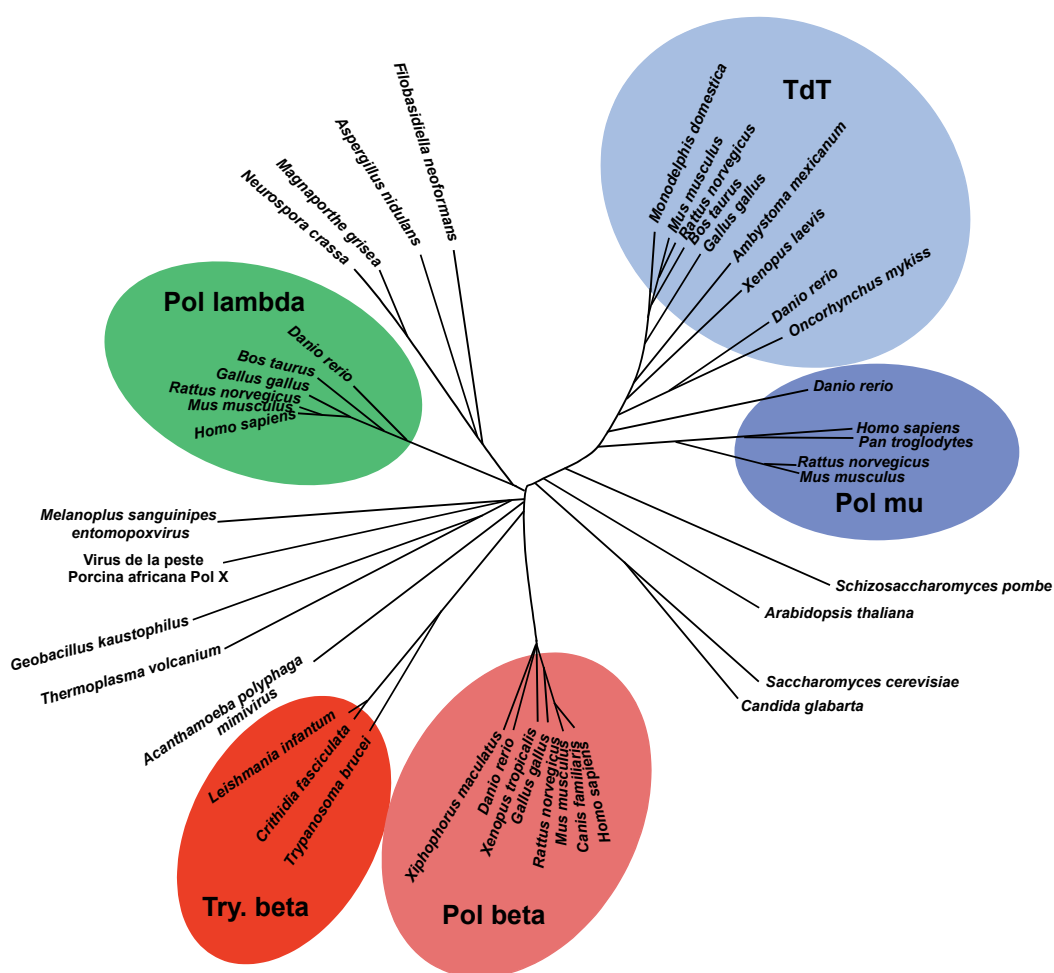


Figura 89. Relación evolutiva de los miembros de la Familia X de DNA polimerasas. Árbol filogenético realizado empleando un segmento corto y muy conservado perteneciente al dominio catalítico, con el fin de evitar que dominios accesorios interfiriesen en el análisis. Las diferentes DNA polimerasas se agrupan en subfamilias: Pol lambda, Try Pol beta (Pol β de tripanosomas), Pol beta, Pol mu y TdT. (Figura tomada de Garcia-Diaz et al., 2005).

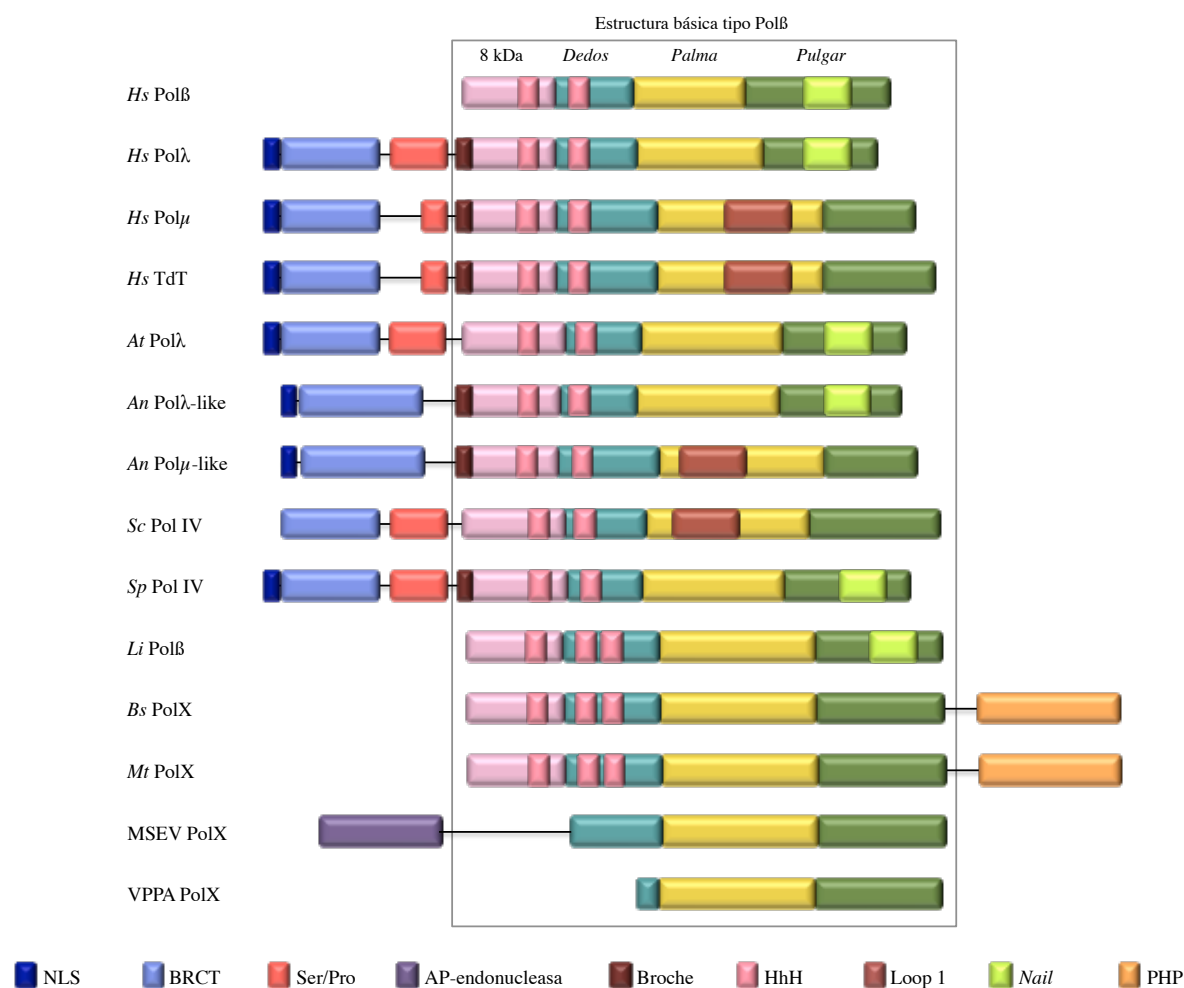


Figura 90. Organización modular de los miembros de la Familia X de DNA polimerasas. Representación esquemática de los dominios de la familia, desde virus hasta eucariotas superiores. Hs: *Homo sapiens*; At: *Arabidopsis thaliana*; An: *Aspergillus nidulans*; Sc: *Saccharomyces cerevisiae*; Sp: *Schizosaccharomyces pombe*; Li: *Leishmania infantum*; Bs: *Bacillus subtilis*; Mt: *Methanobacterium thermoautotrophicum*; MSEV: *Melanoplus sanguinipes entomopoxvirus*; VPPA: virus de la peste porcina africana.

Todos los miembros de la Familia X de los diferentes reinos comparten el núcleo catalítico tipo Pol β , cuya versión más reducida la encontramos en el virus de la peste porcina africana (VPPA, **Figura 90**) (Oliveros et al., 1997). Tanto VPPA como MSEV (*Melanoplus sanguinipes entomopoxvirus*) carecen del dominio 8 kDa, lo que sugiere que para suplir su ausencia el genoma viral codifica para otras proteínas con actividades catalíticas como dRP liasa y con capacidad de unión al DNA. La actividad AP liasa de VPPA hace pensar en su posible implicación en la ruta BER viral (García-Escudero et al., 2003). La adquisición de dominios adicionales con funciones reguladores y/o propiedades enzimáticas ha determinado la divergencia evolutiva de la Familia X. Así, la PolX del virus MSEV presenta un dominio con actividad AP-endonucleasa en su extremo N-terminal, y las de eubacterias (*Bacillus subtilis*) y arqueobacterias (*Methanobacterium thermoautotrophicum*) poseen un

dominio fosofdiesterasa (PHP) en su extremo C-terminal. Ambas actividades suponen un beneficio en la rutas de reparación de BER de estos organismos.

Los miembros de la Familia X de eucariotas presentan grandes diferencias en los dominios adicionales, desde protozoos (*Leishmania infantum*) hasta mamíferos. *LiPolβ* presenta una identidad de secuencia del 31% con *Polβ* de mamíferos, muy cercana al 32% existente entre *Polβ* y *Polλ*. Debemos destacar que *LiPolβ* presenta en su *core* inserciones que median interacciones proteína-proteína y proteína-DNA (Taladriz et al., 2001).

Los hongos pueden ser divididos en dos grupos en función del número de DNA polimerasas de la Familia X que poseen. En el primer grupo encontramos las levaduras, que presentan una única polimerasa de esta familia, denominada Pol IV. Tanto Pol IV de *S. pombe* (*SpPol IV*) como de *S. cerevisiae* (*ScPol IV*) poseen en su extremo N-terminal un dominio BRCT y un dominio de regulación Ser/Pro. Ambas presentan actividad dRP liasa en su dominio 8 kDa, lo que las relaciona con procesos de reparación mediante BER (Bebenek et al., 2005; González-Barrera et al., 2005). *ScPol IV* posee una identidad de secuencia del 25% con *Polλ*, mientras que *SpPol IV* comparte un 27% de identidad de secuencia con *Polμ*, por lo que evolutivamente se podrían considerar ortólogos de *Polλ* y *Polμ* respectivamente. Sin embargo, si observamos los dominios adicionales que poseen ambas polimerasas, su relación evolutiva con *Polλ* y *Polμ* no es tan clara. Al igual que *Polλ*, *SpPol IV* posee en su dominio *pulgar* la región del “nail”, mientras que *ScPol IV* se caracteriza por tener un Loop 1 tipo *Polμ*. Además, llama la atención que solo ésta última posee la región del *broche*, siendo su secuencia *Polμ-like* (YACQR). El segundo grupo de hongos se caracteriza por tener dos DNA polimerasas de la Familia X, una *Polλ-like* y una *Polμ-like*. Ejemplos de este grupo son los géneros *Aspergillus* y *Neurospora*. La gran similitud entre ambas polimerasas y *Polλ* hacen pensar que las dos provienen de una evolución divergente del ancestro común tipo *Polλ* (revisado por Uchiyama et al., 2009).

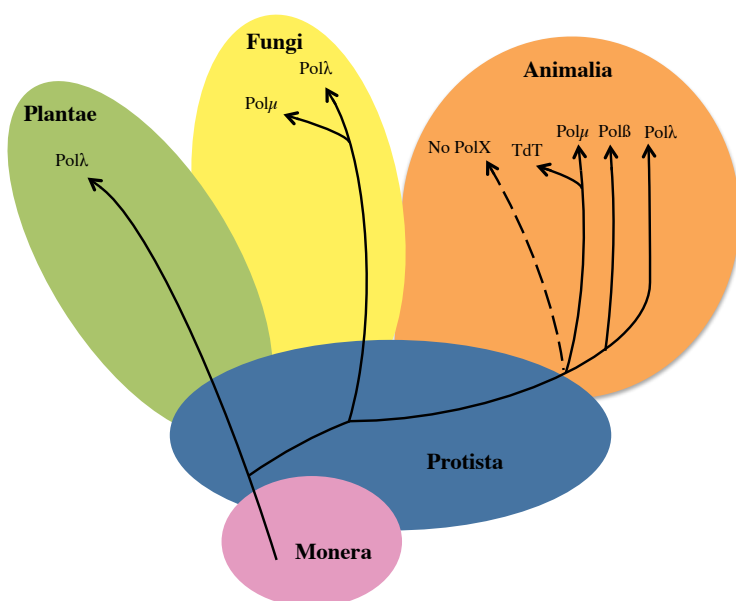


Figura 91. Divergencia evolutiva de las DNA polimerasas de la Familia X en los diferentes reinos. Los homólogos de *Polλ* están presentes en todos los eucariotas excepto en *D. melanogaster* y *C. elegans* (No PolX). La gran identidad de secuencia de *Polλ* con las polimerasas de la familia en todos los reinos hace pensar que es el miembro más parecido al ancestro común de la Familia X. (Modificada de Uchiyama et al., 2009).

La extraordinaria conservación evolutiva de Pol λ en eucariotas indica que Pol λ es el miembro de la Familia X más parecido al ancestro común, del que han ido surgiendo a lo largo de la evolución los demás miembros (**Figura 91**). Este hecho explicaría la variedad de funciones celulares en las que interviene Pol λ . Los demás miembros de la Familia X en humanos habrían surgido de la especialización necesaria para llevar a cabo los diferentes procesos celulares en los que intervienen: reparación por escisión de bases (BER) en la que participan Pol β y Pol λ , reparación por reunión de extremos no homólogos (NHEJ) llevada a cabo por Pol λ y Pol μ , y recombinación V(D)J desarrollada por Pol λ , Pol μ y TdT con funciones no redundantes. Diferencias estructurales entre las polimerasas de esta familia puedan desembocar en sus correspondientes propiedades bioquímicas. Estas variaciones han sido el principal objeto de estudio de esta Tesis Doctoral con el objetivo de comprender mejor las particularidades estructurales y funcionales que hacen que sus funciones no sean redundantes.

2. Dominios estructurales que confieren identidad propia a las DNA polimerasas de la Familia X

2.1 Dominio BRCT

Estudios recientes han revelado que el genoma humano codifica 23 proteínas con dominios BRCT (Woods et al., 2012). La mayor parte de ellas están implicadas en el metabolismo del DNA, como las DNA polimerasas o proteínas asociadas a las mismas (Pol λ , Pol μ , TdT, Rev1 y RFC1) y las DNA ligasas (Ligasa IV). Análisis de las redes de interacciones de proteínas que poseen dominios BRCT muestran que en su mayoría son proteínas que forman parte de la respuesta al daño en el DNA (DDR) y en el control del ciclo celular, jugando por tanto un papel muy importante en la señalización del daño en el DNA y el mantenimiento de la estabilidad genómica. Las proteínas que poseen dominios BRCT pueden ser clasificadas en dos grupos: aquellas que poseen un solo dominio BRCT y aquellas con más de un dominio BRCT situados en tándem (tBRCT). Las polimerasas de la Familia X con dominio BRCT en su extremo N-terminal (Pol λ , Pol μ y TdT) forman parte del primer grupo. La proteína I de unión a la topoisomerasa II (TOPBP1) y la proteína I de unión a p53 (TP53BP1) son ejemplos del segundo grupo. Aunque inicialmente los dominios BRCT fueron descritos como dominios de reconocimiento e interacción de fosfopéptidos (Manke et al., 2003; revisado en Leung & Glover, 2011), en los últimos años se ha descrito la función del dominio BRCT en la unión al DNA. Así, la subunidad p140 del Factor de Replicación C (RFC) es capaz de unir extremos de DNA 3' protuberantes con grupos 5'P (Kobayashi et al., 2006) y la DNA polimerasa Pol μ incrementa la eficiencia de la reparación mediante NHEJ gracias a la contribución del BRCT a la unión del enzima a los extremos de DNA (Martin et al., 2012).

A pesar del mantenimiento de la estructura de los dominios BRCT conocida como “sándwich $\alpha\beta\alpha$ ”, en la que 4 láminas β paralelas están flanqueadas por 3 hélices α (Zhang et al., 1998), existen muchas variaciones entre proteínas, sobre todo en los *loops* que conectan unos motivos con otros. La identidad de secuencia del dominio BRCT dentro de la Familia X difiere de unas polimerasas a otras: Pol μ y TdT, más cercanas evolutivamente guardan un 39% de identidad de secuencia en sus BRCTs. Sin embargo, Pol λ y Pol μ guardan un 23%, y Pol λ y TdT apenas comparten un 20% de identidad de secuencia. La leve conservación evolutiva hace pensar en un papel característico de BRCT en cada una de las polimerasas. El intercambio del BRCT de Pol μ por el BRCT de Pol λ junto con su dominio Ser/Pro, realizado como parte de esta Tesis, demuestra que estos dominios no son permutables. La afinidad de Pol λ por extremos 3' protuberantes se ve incrementada cuando posee el BRCT de Pol μ . Sin embargo, la capacidad de llevar a cabo reacciones en extremos incompatibles no es adquirida por la proteína quimérica, alterando además la eficiencia de la reacción en extremos de DNA complementarios. La comparación estructural del BRCT de Pol λ y Pol μ muestra la variación de la estructura en la α -hélice 2 relacionada con la protección de las láminas β . Sin embargo, la mayor variación en la Familia X la observamos en el *loop* que conecta la hélice α 2 y la lámina β 4. Como muestra nuestro estudio, estas variaciones en la estructura son determinantes en la función de los BRCT tanto de Pol λ como de Pol μ . Podemos pensar que el análisis *in vivo* de las proteínas quiméricas del BRCT pondría también de manifiesto la alteración de las interacciones de Pol λ con los factores de NHEJ y por tanto su capacidad de reparación de DSBs por este mecanismo. El hecho de las proteínas quiméricas obtenidas Pol λ (BRCT μ) y Pol λ (BRCT μ +YACQR μ) se comporten de diferente manera, alejándose más de Pol λ WT la primera de ellas, demuestra la importancia de estos 5 residuos. La unión del BRCT al *core* de Pol λ no es el mismo en ambos casos, por lo que el plegamiento global de la proteína no se produce de la misma manera, provocando una mayor alteración de las propiedades bioquímicas en aquella con una mayor perturbación estructural.

2.2 Dominio Ser/Pro

En Pol λ el dominio BRCT y el *core* catalítico están unidos por el denominado dominio Ser/Pro, una región de unos 100 aminoácidos rica en Ser, Pro y Thr. Esta región de conexión es mucho más pequeña en Pol μ y TdT y está ausente en Pol β . La importancia de esta región reside en su susceptibilidad de ser diana de regulación mediante fosforilaciones o glicosilaciones (García-Díaz et al., 2000). Análisis comparativos de secuencias entre Pol λ en humanos y en ratón muestran que a pesar de que la menor identidad de secuencia entre ambas se observa en la región Ser/Pro, los residuos más conservados son precisamente Ser, Pro y Thr, destacando su importancia (García-Díaz et al., 2002). Frouin y colaboradores demostraron la fosforilación de esta región por los complejos Cdk2/CycA (Frouin et al., 2005). Mutantes de delección de Pol λ , en los que se eliminan tanto el dominio BRCT como el Ser/Pro muestran por un lado una mayor actividad polimerasa y un aumento

en el desplazamiento de banda (Fan & Wu, 2004) y sugieren por otra parte, un papel importante de la región Ser/Pro en la fidelidad de inserción de Pol λ (Fiala et al., 2006). Pol μ solo posee un sitio consenso de fosforilación por complejos Cdk en su pequeña región Ser/Pro coincidente con uno de los descritos para Pol λ . En Pol μ la mayor regulación por fosforilación se da en el dominio BRCT y en la región del Loop 1 (Esteban et al., 2013).

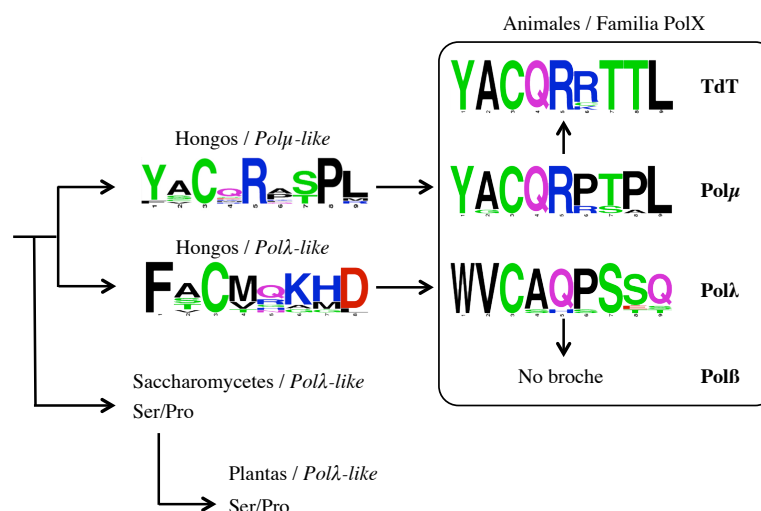
2.3 El *broche*

En Pol λ , Pol μ y TdT encontramos en el extremo N-terminal de su dominio de polimerización el motivo *broche*, una región de 5 aminoácidos ausente en Pol β y potencialmente encargada de mantener la conformación cerrada de las polimerasas que lo poseen a lo largo de su ciclo catalítico. Estando muy conservada a lo largo de la evolución, la secuencia de esta región difiere entre Pol λ (WVCAQ), y Pol μ y TdT (YACQR). A pesar de que las estructuras disponibles de Pol λ no incluyen esta región, teniendo en cuenta los datos estructurales de Pol μ podemos pensar en el papel de este motivo en el mantenimiento de la conformación cerrada de Pol μ , TdT y Pol λ a lo largo del ciclo catalítico. La ausencia del motivo *broche* en Pol β facilitaría los cambios conformacionales de su dominio 8 kDa respecto al dominio *pulgar*. El complejo ternario de Pol λ en un *gap* de 2 nucleótidos demuestra que la disposición de la polimerasa en este sustrato viene determinada por el correcto posicionamiento del dominio 8 kDa respecto al grupo 5'P (García-Díaz et al., 2004). Esta unión es de especial relevancia a la hora del reconocimiento y unión de Pol λ a extremos de DNA intermediarios de reacciones de NHEJ. La polimerasa debe adquirir una conformación que permita a todos los elementos implicados en la catálisis (iniciador, cadena molde, nucleótido entrante, metales y residuos del centro activo de la proteína) estar correctamente posicionados. De acuerdo con esta hipótesis, mutantes puntuales en los residuos más conservados de esta región de Pol λ (Trp²³⁹, Cys²⁴¹, Gln²⁴³) y de la Ser²⁴⁵, fuera del *broche* pero muy conservada en Pol λ y en Pol (Thr¹⁴⁷) y TdT (Thr¹⁵⁹) han demostrado la importancia del mantenimiento de la correcta arquitectura de esta región en la función de Pol λ . Al distorsionar la disposición del *broche*, Pol λ ve disminuida su capacidad de reparación de DSBs mediante NHEJ, así como la reparación de *gaps* largos en el DNA. Este hecho puede deberse a que el *broche* está muy cercano al sitio *scrunching*, necesario para un completo relleno de los mismos. Sin embargo, la reparación de sustratos tipo GAP1P apenas se ve alterada, lo que coincide con la ausencia de este motivo en Pol β , especializada en este tipo de sustratos.

Realizando análisis comparativos de secuencia podemos observar cómo la región del *broche* está muy conservada a lo largo de la evolución. Las DNA polimerasas de la Familia X de *Ascomycota* pueden ser divididas en tres grupos. El primer grupo, Pol λ -like, posee un *broche* similar al de Pol λ (Figura 92A). El segundo grupo Pol μ -like, se caracteriza por estar más cercano evolutivamente al *broche* de Pol μ y TdT. El tercer grupo, los *Saccharomycetales* no posee la región del *broche*, estando su dominio Ser/Pro directamente unido al dominio de 8 kDa. En plantas, Pol λ tampoco posee este

motivo, quedando patente la posible relación evolutiva de estos dos grupos (Figura 92A). Como hemos mencionado anteriormente, en animales, la secuencia del *broche* de Pol μ y TdT es prácticamente invariante (YACQR). Pol λ difiere en la secuencia pero está igualmente conservada (WVCAQ), siendo Pol β la única polimerasa de la familia que carece de esta región.

A



B

Ascomycota Pol λ -like	Ascomycota Pol μ -like	Pol λ	Pol μ	TdT
<i>A. nidulans</i> FVCMQKHD <i>A. clavatus</i> FTCMQKHD <i>A. oryzae</i> FACVQKHD <i>A. flavus</i> FACVQKHD <i>A. niger</i> FACMQKHD <i>A. terreus</i> FACMRAHD <i>A. capsulatus</i> FSCMHKHD <i>A. otae</i> FSCMGKMD <i>T. rubrum</i> FTCMNKMD <i>V. dahliae</i> FACTRGGL	<i>S. pombe</i> YACQRKTPPL <i>D. squalens</i> YACQRPSPL <i>S. hirsutum</i> FACERPSPPL <i>C. cinerea</i> YVCQRASPL <i>T. versicolor</i> YACQRASPL <i>S. commune</i> YACCRASPL <i>P. indica</i> YCCQRQTPL <i>L. bicolor</i> YACKRASPL <i>U. maydis</i> YACRRPSPL <i>M. osmundae</i> YSCMRLSPL <i>C. militaris</i> YSCQRPTPM	<i>H. sapiens</i> WVCAQPSsq <i>P. abelii</i> WVCAQPSsq <i>M. mulatta</i> WVCAQPSsq <i>R. norvegicus</i> WVCAQPSsq <i>M. musculus</i> WVCAQPSsq <i>B. taurus</i> WVCAQPSsq <i>M. domestica</i> WVCAQPSsq <i>C. lupus</i> WVCAQPSsq <i>D. rerio</i> WVCSQPSTT <i>X. tropicalis</i> WVCAHSSES	<i>H. sapiens</i> YACQRPTPL <i>P. abelii</i> YACQRPTPL <i>P. anubis</i> YACQRPTPL <i>R. norvegicus</i> YACQRPSPL <i>M. musculus</i> YACQRPSPL <i>B. taurus</i> YACQRPTPL <i>S. scrofa</i> YACQRPTPL <i>C. griseus</i> YACQRPTPL <i>D. rerio</i> YACQRPTPL <i>X. tropicalis</i> YGQRRTPPL	<i>H. sapiens</i> YACQRRRTL <i>P. abelii</i> YACQRRRTL <i>M. mulatta</i> YACQRRRTL <i>S. scrofa</i> YACQRRRTL <i>B. taurus</i> YACQRKRTL <i>C. lupus</i> YACQRRRTL <i>M. musculus</i> YACQRRRTL <i>C. griseus</i> YACQRRRTL <i>D. rerio</i> YACQRRRTL <i>X. laevis</i> YACQRCRTL

Figura 92. Evolución del motivo *broche*. A. Representación del logo de las secuencias del *broche* y evolución del mismo en los animales, hongos y plantas. B. Alineamiento de las secuencias utilizadas para la creación de los logos. Los números de la parte superior de las figuras indican la posición del residuo en relación al extremos N-terminal de Pol λ , Pol μ y TdT.

Cabe destacar que existen tanto en Pol λ como en Pol μ sitios consenso de fosforilación muy próximos a la región del *broche*. Un estudio reciente de nuestro laboratorio mostró que la Thr¹⁴⁷ de Pol μ es fosforilada *in vitro* por el complejo Cdk2/CycA, comprometiendo la reparación de DSBs cuando los extremos de DNA son incompatibles (Martin et al., 2013). Por su parte, Pol λ presenta dos sitios de fosforilación cercanos al *broche*: el primero de ellos es un sitio consenso de fosforilación por Cdk situado en el dominio Ser/Pro (Ser²³⁰); el segundo, un sitio consenso para ATM, se encuentra al inicio del dominio de 8 kDa (Ser²⁴⁶, Matsuoka et al., 2007). Por tanto podemos afirmar que la región del *broche* va a jugar un papel muy importante tanto en la arquitectura de la polimerasa como en la regulación de su actividad.

2.4 Dominio *palma*

El primer cristal disponible de la estructura de Pol β de rata (Sawaya et al., 1994) reveló la similitud estructural con polimerasas ya conocidas como la RNA polimerasa de T7 o la retrotranscriptasa del VIH. La estructura básica de este dominio está formada por dos hélices α que empaquetan un conjunto de láminas β . Sin embargo, el dominio *palma* de Pol β muestra dos características diferentes al resto. Por un lado destaca la presencia de dos láminas β paralelas (lo común es que sean todas ellas antiparalelas). Por otra parte, destaca la particularidad de que tanto en estructura primaria como terciaria los dominios de Pol β y del resto de polimerasas de la Familia X son consecutivos. A pesar de que la topología de este dominio difiere entre las familias A, B, X e Y, los aspárticos catalíticos de todas ellas se localizan en el dominio *palma* y el DNA, el nucleótido entrante y los metales pueden ser estructuralmente alineados (Steitz et al., 1994).

Si analizamos las diferencias estructurales del dominio *palma* entre Pol β , Pol λ , Pol μ y TdT destaca el tamaño del denominado Loop 1, que une las láminas β 3 y 4. En Pol μ y TdT el Loop 1 es una pieza de gran tamaño, móvil y flexible que juega un papel muy importante en la actividad transferasa terminal de estas polimerasas (Juárez et al., 2006). En Pol λ el Loop 1 es unos 10 residuos más pequeño y en Pol β apenas se define como un giro entre las dos láminas β . El Loop 1 es uno de los principales motivos por los que Pol μ y TdT polimerizan de forma independiente de molde. En la estructura de TdT en complejo binario con un sustrato de DNA de banda simple observamos como el Loop 1 ocupa la posición equivalente al DNA molde (Delarue et al., 2002).

La obtención de una proteína quimérica de Pol λ en la que hemos sustituido su Loop 1 por el de Pol μ , demuestra que a pesar de ser un elemento clave para la actividad transferasa terminal, no es el único implicado en ella. Ni Pol λ (Loop1 μ), ni Pol λ (Loop1 μ +Nail μ) adquirieron la capacidad de polimerización independiente de molde.

Un segundo elemento clave para la actividad transferasa terminal lo encontramos en el centro activo de Pol μ y TdT (Moon, Garcia-Diaz, Bebenek, et al., 2007). La His³²⁹ de Pol μ está conservada en TdT (His³⁴²) pero no en Pol λ (Gly⁴²⁶) ni en Pol β (Gly¹⁸⁹). En el complejo ternario de Pol μ , la His³²⁹ contacta con el extremo del iniciador y con fosfato γ del nucleótido entrante (**Figura 93A**). Estas interacciones son cruciales para su correcto posicionamiento durante las reacciones independientes de molde. Mutaciones de esta His comprometen de manera significativa la actividad transferasa terminal de Pol μ (Moon et al., 2007; Andrade et al., 2009).

A pesar de que en Pol λ la Gly⁴²⁶ interacciona con el nucleótido entrante (**Figura 93A**), no se observa ninguna interacción con el extremo 3' del iniciador. En las polimerasas dependientes de molde el correcto posicionamiento del iniciador viene determinado por la afinidad de éstas con la base molde. A diferencia de lo que ocurre en Pol β , en Pol λ no se producen grandes cambios estructurales

con la llegada del nucleótido entrante. Los principales cambios conformacionales que se observan son cambios en las cadenas laterales de los residuos del centro activo y un desplazamiento de la cadena molde del DNA (Garcia-Diaz et al., 2005; Garcia-Diaz et al., 2005b). La catálisis viene determinada por las interacciones de residuos del dominio *pulgar* (Tyr⁵⁰⁵, Asn⁵¹³ y Arg⁵¹⁷) de Polλ con el surco menor de DNA: con la base molde en posición T₁ y con la base molde que aparea con el extremo 3' del iniciador (en posición T₀) (**Figura 93B**). Son las dos bases molde directamente implicadas en la catálisis. Teniendo en cuenta las interacciones descritas de Polμ con el iniciador y de Polλ con el surco menor del DNA, podemos entender la ausencia de actividad transferasa terminal en Polλ(Loop1μ) y Polλ(Loop1μ+Nailμ).

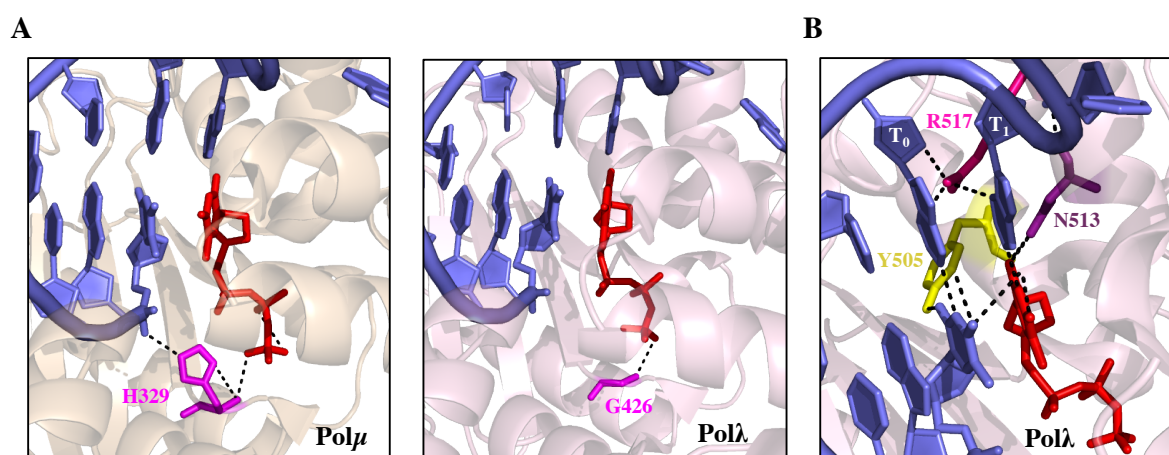


Figura 93. Representación en *cartoon* de las estructuras en complejo ternario de Polμ (PDB id 2IHM) y Polλ (PDB id 1XSN). A. A la izquierda se muestra la interacción de la His³²⁹ (magenta) de Polμ con el nucleótido entrante (rojo) y el extremo del iniciador (azul). A la derecha se muestra la interacción de la Gly⁴²⁶ de Polλ (magenta) con el nucleótido entrante (rojo). B. Detalle de las interacciones de las bases molde T₀ y T₁ y el extremo del iniciador con los residuos Tyr⁵⁰⁵, Asn⁵¹³ y Arg⁵¹⁷ del dominio *pulgar* de Polλ.

Polλ posee la capacidad intrínseca de reparar DSBs mediante NHEJ y en ninguna de las quimeras se ha alterado el dominio de 8 kDa, por lo que puede darse el reconocimiento del grupo 5'P de los extremos de DNA. Sin embargo, ninguna de estas polimerasas quiméricas a pesar de poseer el Loop 1 de Polμ que pueda actuar de pseudo-molde, es capaz de completar reacciones de NHEJ cuando los extremos de DNA son incompatibles. Modelando la estructura de Polλ(Loop1μ) sobre el cristal en complejo ternario de Polλ (PDB id 1XSN) observamos que el Loop 1 de Polμ ocupa la misma posición que el de Polλ (**Figura 94**). Esta posición no le permitiría actuar de pseudo-molde en ausencia de complementariedad y por su mayor tamaño podría interferir en reacciones de NHEJ con extremos compatibles, como de hecho observamos por la bajada de actividad que presenta en este tipo de extremos. Cuando el modelado lo llevamos a cabo sobre el cristal de TdT (PDB id 1JMS), observamos que el Loop 1 ocupa una región cercana al *nail* de Polλ (**Figura 94**), lo que provoca un movimiento de este motivo hacia fuera. Un impedimento estérico entre el Loop 1 y el *nail* supondría una dificultad adicional a la reunión de dos extremos de DNA durante una reacción de NHEJ. Sin

embargo, en $\text{Pol}\lambda(\text{Loop}1\mu+\text{Nail}\mu)$ donde hemos intercambiado también la región del *nail* de $\text{Pol}\lambda$ por el de $\text{Pol}\mu$ con el objetivo de evitar la incompatibilidad de estos motivos (**Figura 94**), tampoco observamos reacción en ausencia de complementariedad. Este hecho, acompañado de la disminución en la eficiencia de NHEJ en extremos compatibles de las proteínas quiméricas, revela que tanto $\text{Pol}\lambda$ como $\text{Pol}\mu$ han evolucionado para especializarse en funciones no redundantes durante la reparación de DSBs. La complementariedad de los extremos va a determinar la polimerasa implicada en la reacción. En este mecanismo de reparación no solo entran en juego motivos estructurales como el Loop 1, si no que los contactos de los residuos del centro activo de las polimerasas, bien con el surco menor del DNA y la zona molde, bien estabilizando el extremo del iniciador, van a determinar su función y especificidad.

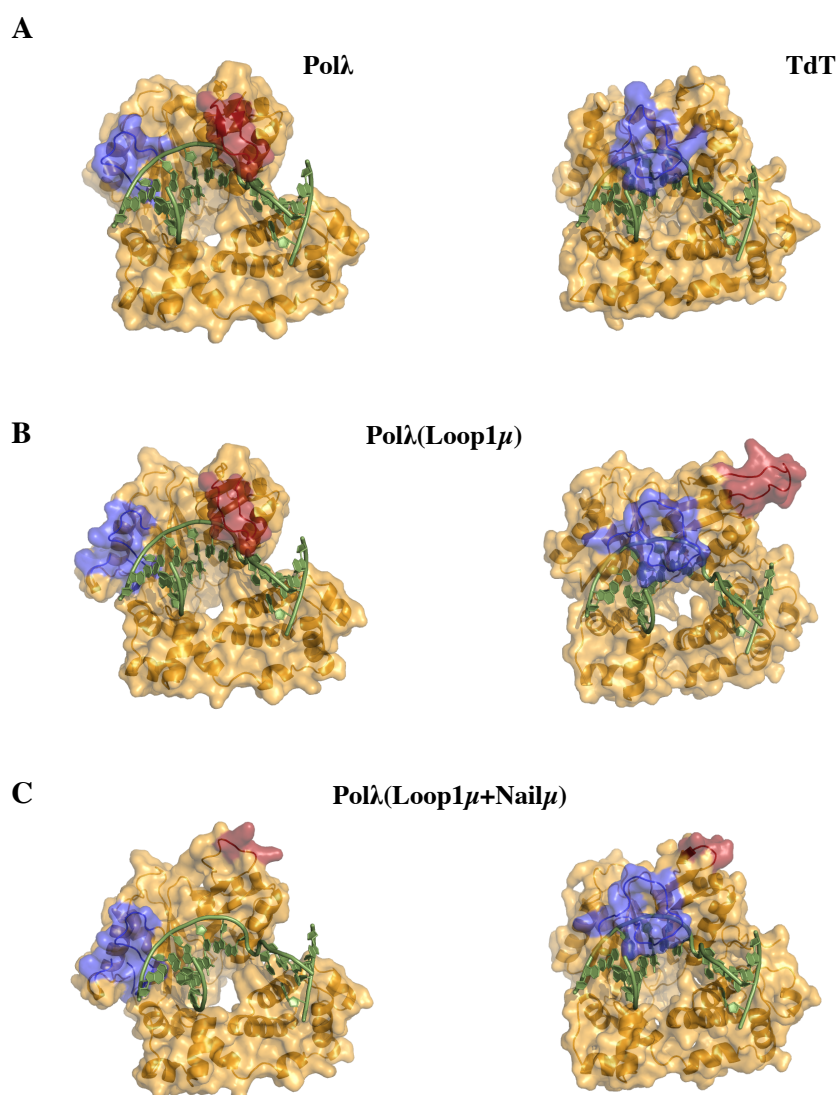


Figura 94. Modelado estructural de las proteínas quiméricas del Loop 1 de $\text{Pol}\lambda$. **A.** Representación en *cartoon* de $\text{Pol}\lambda$ (PDB id 1XSN; derecha) y de TdT (PdB id 1JMS; izquierda). **B.** Modelado de la estructura de $\text{Pol}\lambda(\text{Loop}1\mu)$ sobre la estructura de $\text{Pol}\lambda$ (PDB id: 1XSN; derecha) y sobre la estructura de TdT (PDB id 1JMS; izquierda). **C.** Modelado de la estructura de $\text{Pol}\lambda(\text{Loop}1\mu+\text{Nail}\mu)$ sobre la estructura de $\text{Pol}\lambda$ (PDB id: 1XSN; derecha) y sobre la estructura de TdT (PDB id 1JMS; izquierda). En todos los casos se muestra en morado el Loop 1 y en rojo la región del *nail*.

No debemos perder de vista que Pol λ posee un Loop 1 en su dominio *palma* que le confiere identidad propia. La especialización de Pol λ para reparar roturas con extremos compatibles es consecuencia directa de las características de su Loop 1. La estabilización de los extremos de DNA mediante contactos del Loop 1 con cadena molde, hacen que Pol λ sea muy eficiente en extremos con complementariedades de 3 y 4 pb. La pérdida de estos contactos en ausencia de esta región compromete la eficiencia de la reparación en extremos compatibles de 4 pb, a la vez que disminuye la fidelidad de Pol λ (Bebenek et al., 2010).

2.5 Dominio *pulgar*

El cambio de Pol β de una conformación “abierta” a una “cerrada” con la llegada del nucleótido es consecuencia de movimientos en su dominio *pulgar* (W. A. Beard & Wilson, 1998). El cierre de este dominio provoca un movimiento del dominio de unión al nucleótido hacia el extremo 3'-OH del iniciador favoreciendo la catálisis (Sawaya et al., 1997). En Pol λ no encontramos este cambio conformacional tan acusado del dominio *pulgar*, si no un desplazamiento del DNA como muestran las simulaciones (Foley et al., 2006) y las estructuras cristalográficas (Garcia-Diaz et al., 2005; Garcia-Diaz et al., 2005). En Pol μ la situación es similar a la de Pol λ (Yunlang Li & Schlick, 2010).

En el dominio *pulgar* encontramos dos regiones principales en las que difieren las polimerasas de la Familia X. La primera de ellas es el motivo YFTGS presente en Pol β y Pol λ implicado directamente en las interacciones con el surco menor del DNA y el correcto posicionamiento del iniciador para que la catálisis tenga lugar. En este motivo se encuentra la Tyr⁵⁰⁵ de Pol λ , mencionada anteriormente y cuya interacción con el iniciador puede observarse en la [figura 93B](#). Pol μ y TdT se caracterizan por su motivo GWTGS, donde los residuos Gly y Trp son los responsables de la baja discriminación entre ribonucleótidos y desoxinucleótidos (Nick McElhinny et al., 2003; Ruiz et al., 2003). La segunda región de este dominio es la región del *nail* (“uña” como prolongación del dominio *pulgar*). Presente en Pol β y Pol λ , se sitúa sobre el DNA estableciendo contactos con la zona *downstream* del DNA molde. Se ha descrito que en Pol β esta región juega un papel muy importante estableciendo interacciones con proteínas de reparación (Gryk et al., 2002), mientras que en Pol λ se ha descrito su implicación en la estabilización de bases extra-helicoidales en el DNA (Garcia-Diaz et al., 2006), mediante el apilamiento con la Lys⁵⁴⁴. La eliminación de esta región de Pol λ tiene como consecuencia una disminución de su eficiencia catalítica. En Pol μ la región del *nail* es más pequeña. El Trp⁴⁵⁵ de Pol μ cercano a esa región podría jugar un papel similar a la Lys⁵¹⁴ de Pol λ en la estabilización de bases (Moon et al., 2007).

El intercambio del *nail* de Pol λ por el de Pol μ revela la importancia de esta prolongación del dominio *pulgar* en Pol λ . La estabilización de las bases extra-helicoidales se ve comprometida en Pol λ (Nail μ). A medida que la base extra está desplazada hacia la zona *upstream* del sitio catalítico, el

nail se vuelve más prescindible, demostrando así la importancia de las interacciones de sus residuos con el DNA. Como hemos explicado anteriormente, la Arg⁴³⁸ y la Lys⁵¹⁴ contactan con el DNA molde mientras que el resto de residuos del *nail* se sitúan sobre el mismo como si lo plancharan. Estos contactos los encontramos también en sustratos de DNA que están perfectamente alineados, lo que nos indica que la función del *nail* no solo es relevante para la estabilización de bases extra-helicoidales, si no que desempeña una función más primaria, como demuestra la bajada de actividad de Polλ(Nailμ) en sustratos tipo GAP1P.

Polλ se caracteriza por poseer una tasa de error de inserciones/delecciones (indels) muy superior a la de Polβ, superando incluso a las polimerasas de la Familia Y conocidas por su infidelidad (Bebenek et al., 2003). Estos errores son más frecuentes en secuencias repetidas donde puede darse el deslizamiento del molde siguiendo el modelo de Streisinger (Streisinger et al., 1966). El *nail* de Polλ participa en este proceso, ayudando al deslizamiento de la base molde en posición T₁, siendo la primera base copiada la que encuentra se en posición T₂. En ausencia del *nail*, [Polλ(Nailμ)] la estabilización de la base deslizada no puede darse, motivo por el cual no observamos este mecanismo.

La importancia del *nail* en la reparación de DSBs mediante NHEJ queda patente por la disminución de la eficiencia de la reparación cuando los extremos de DNA son compatibles. Este hecho pone de manifiesto que Polλ debe sujetar bien dichos extremos no solo por la región *upstream* del sitio activo estabilizando en segundo *gap* de la rotura gracias a su Loop 1, si no que la bases molde T₀ y T₁ y la zona *downstream* del mismo deben estar correctamente posicionadas mediante interacciones con el *nail*.

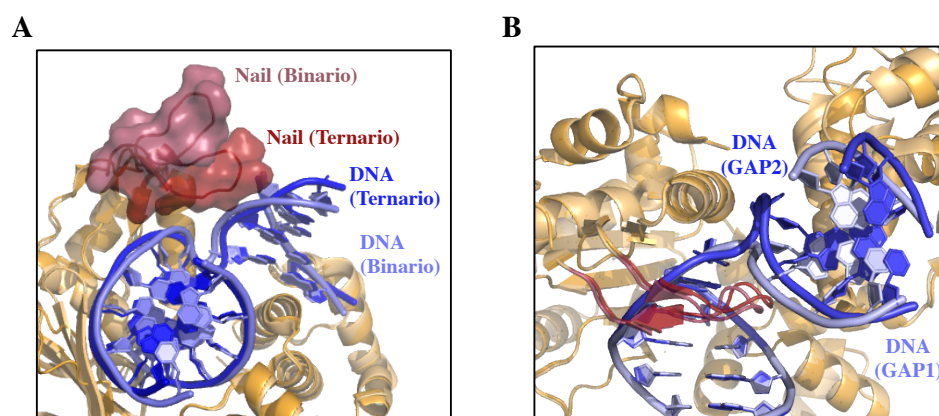


Figura 95. Importancia de la región del *nail* en la unión al DNA. A. Representación en *cartoon* de Polλ en complejo binario y ternario (PDB id 1XSL, naranja y 1XSN, naranja claro respectivamente). Se observa el cambio estructural de la región del *nail* y el movimiento del DNA. B. Representación en *cartoon* de Polλ en complejo ternario con DNA de GAP1 y GAP2 (PDB id 1XSN, naranja y 3HWT naranja claro respectivamente). Se muestra la región del *nail* en rojo y cereza respectivamente. La base en posición +2 del GAP2 se localiza en el bolsillo de *scrunching*.

El *nail* de Pol λ no es una pieza rígida. Como hemos explicado anteriormente, cambia de posición del complejo binario al ternario acompañando el movimiento del DNA hacia el centro activo (**Figura 95A**) y permitiendo a la cadena molde posicionarse correctamente para la catálisis. Pol λ a diferencia de Pol μ , “cuenta” correctamente las bases molde del DNA, copiándolas una a una. Pol μ tiende a copiar la base más cercana al extremo 5'P del *gap* (Juárez et al., 2006). Para que en un *gap* de longitud mayor de 1 nucleótido Pol λ copie correctamente las bases del molde, ha desarrollado un mecanismo de *scrunching* en el que las bases en posición +2, +3... se sitúan en un bolsillo situado entre el dominio *pulgar* y el dominio de 8 kDa, permitiendo a Pol λ unirse al grupo 5'P e insertar el nucleótido correcto frente a la primera base molde (T₁) (García-Díaz et al., 2009) (**Figura 95B**). El hecho de que Pol μ no posea la región del *nail* y que no “cuente” correctamente las bases del DNA molde, podría hacernos pensar que el *nail* de Pol λ ayuda al posicionamiento de las bases que aún no van a ser copiadas en el bolsillo de *scrunching*. Sin embargo, nuestros resultados muestran que Pol λ (Nail μ) es capaz de copiar correctamente las bases molde en un *gap* de 2, de 3 y de 5 nucleótidos. Al igual que ocurre con el Loop 1, no son solo motivos estructurales tan llamativos como el Loop 1 o el *nail* los que van a determinar el comportamiento de las polimerasas, si no que entra en juego una compleja red de interacciones entre los residuos de la proteína, el DNA y el resto de elementos participantes en la catálisis.

Realizando estudios comparativos de estructuras primarias de las polimerasas de la Familia X lo largo de la evolución encontramos que los dos dominios estructurales implicados en las interacciones con el DNA molde son excluyentes: las polimerasas que presentan un Loop 1 grande tipo Pol μ en su dominio *palma*, carecen de la región del *nail* en su dominio *pulgar*; las polimerasas tipo Pol λ , con Loop 1 pequeño, se caracterizan por presentar una región del *nail* grande (**Figura 90**). Además, superponiendo las estructuras cristalográficas de Pol λ y TdT observamos que el *nail* de la primera y el Loop 1 de la segunda, ocupan posiciones muy similares mostrando la incompatibilidad de ambos en la misma polimerasa (**Figura 96**). Las funciones celulares para las se han especializado han determinado la necesidad de tener un motivo u otro. Pol β y Pol λ implicadas en BER y en NHEJ de extremos de DNA compatibles poseen la región del *nail* que les permite polimerizar correctamente. Pol μ , especializada en reacciones de NHEJ en ausencia de complementariedad posee un Loop 1 grande que le permite estabilizar la conexión.

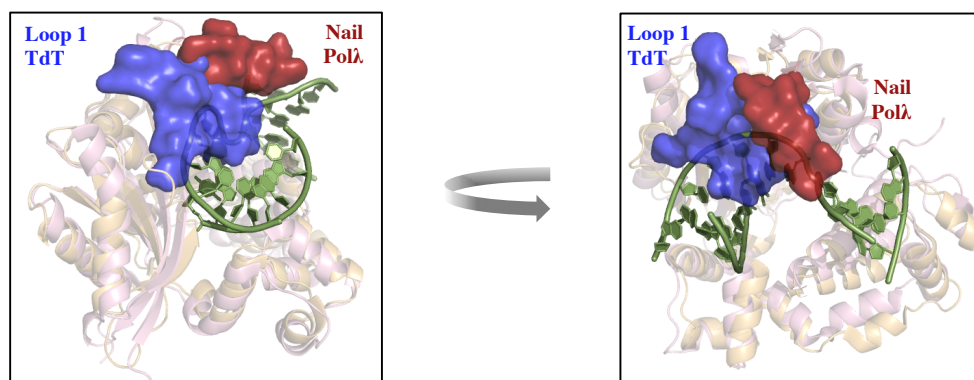


Figura 96. Las regiones del *nail* y el Loop 1 son excluyentes. A. Superposición de la estructura de Polλ (PDB id 1XSN, naranja) y de TdT (PdB id 1JMS, rosa claro). El *nail* de Polλ se muestra en rojo mientras que el Loop 1 de TdT se representa en azul. En la figura se aprecia como ambos dominios se localizan en la misma zona del DNA.

3. Reparación de roturas de doble cadena por Polλ

Las roturas de doble cadena en el DNA son consecuencia directa de la radiación ionizante, del efecto de drogas antitumorales y del metabolismo del DNA (fallos en la replicación o en los procesos de reparación). En la célula hay además eventos programados de roturas en los cromosomas durante la meiosis y durante la generación de variabilidad mediante la recombinación V(D)J. Con el objetivo de mantener la integridad del genoma y no perder información genética, las células han desarrollado diferentes mecanismos de reparación de estas roturas, entre los que destaca la Recombinación Homóloga y la Reunión de Extremos No Homólogos (NHEJ). A pesar de que este último es menos preciso y fiel, es el mayoritario en eucariotas. De las polimerasas de la Familia X, Polλ, Polμ y TdT participan en este proceso. El amplio espectro de dependencia de molde entre estas polimerasas hace pensar que sus funciones no son redundantes (Nick McElhinny & Ramsden, 2004, Nick McElhinny et al., 2005; revisado en Ramsden, 2011). A pesar de que como hemos mencionado anteriormente la implicación de Polλ en el proceso es conocida, hasta la fecha no se ha conseguido profundizar en el tipo de sustratos que es capaz de procesar en ausencia de los factores auxiliares de NHEJ. A lo largo de esta Tesis Doctoral, hemos puesto a punto un ensayo *in vitro* de reparación de DSBs en ausencia de estos factores. Esto nos ha permitido determinar que Polλ es capaz por sí misma de reunir dos extremos de DNA 3' protuberantes y reparar los dos *gaps* que forman la rotura. De acuerdo con su capacidad de utilizar sustratos más sencillos pero que no están perfectamente alineados (Garcia-Diaz et al., 2004; Garcia-Diaz et al., 2006; Picher et al., 2006; Picher & Blanco, 2007; Bebenek et al., 2008), Polλ puede estabilizar extremos de DNA cuya complementariedad de bases no es perfecta, si no que existen apareamientos erróneos o bases extra. Un requisito imprescindible para Polλ en ausencia de factores, es que el extremo 3' del iniciador esté perfectamente apareado. Sin embargo, es probable que la interacción con factores de NHEJ y la estabilización de la rotura por todas proteínas implicadas en el proceso, haga que Polλ pueda completar la reacción incluso con el extremo del

iniciador mal apareado. La versatilidad de Pol λ en reacciones de NHEJ le permite además rellenar *gaps* mayores de un nucleótido. Estos resultados concuerdan además con los obtenidos por el Dr. Dale Rasmden en el que demuestra *in vivo* que Pol λ pero no Pol μ , es capaz de rellenar *gaps* de 2 nucleótidos (comunicación personal).

Cuando se produce una doble rotura en el DNA podemos encontrar bases dañadas que han de ser copiadas o que participan en la conexión que forman los extremos de DNA. La prioridad de la célula debe ser la restauración de la continuidad del genoma reparando en primer lugar las roturas. La función de Pol λ en NHEJ le permite reparar de manera eficiente el DNA incluso en presencia de bases modificadas como 8oxoG. Si la base molde es 8oxoG, Pol λ puede llevar a cabo tanto la inserción correcta de dC, como la inserción de dA, provocando la posible fijación de una mutación. La extensión del par formado 8oxoG:dC en la conexión es menos eficiente que el par correcto dG:dC, mientras que la extensión del par mutagénico 8oxoG:dA es muy similar a del correcto dT:dA. El coste de que Pol λ pueda reparar extremos con bases oxidadas puede ser la fijación de una mutación si posteriormente no se repara. Sin embargo, el coste de no reparar la rotura en el DNA sería mayor y más perjudicial para la célula.

Los motivos estructurales que poseen tanto Pol λ como Pol μ las hacen idóneas para las diferentes situaciones que pueden darse en una rotura de doble cadena. La evolución ha permitido que Pol λ se especialice en roturas con extremos complementarios perfectamente alineados o con distorsiones o bases dañadas, mientras que Pol μ se ha especializado en aquellas roturas no complementarias, siendo una polimerasa más creativa aunque menos fiel. El hecho de que Pol μ sea además capaz de incorporar ribonucleótidos (Nick McElhinny et al., 2003; J. F. Ruiz, 2003), aumenta su versatilidad frente a las roturas de doble cadena. Por su parte, Pol λ se caracteriza por la discriminación entre ribonucleótidos y desoxinucleótidos. Su alta afinidad por estos últimos hace que pueda ejercer sus funciones en situaciones en las que su disponibilidad es menor.

La especialización de Pol λ y Pol μ hace que sean idóneas para la reparación de DSBs. Son capaces de trabajar en situaciones donde otras polimerasas no pueden hacerlo: en extremos de DNA no complementarios, dañados o no correctamente alineados, o cuando escasean los dNTPs. Ambas polimerasas resuelven las roturas en el DNA con el único fin de mantener la integridad del genoma y la viabilidad celular. Sus propiedades les confieren identidad propia, permitiendo que se complementen, sin solapar sus funciones celulares.

4. Variantes y polimorfismos simples de Pol λ

En el mantenimiento de la estabilidad del genoma juegan un papel muy importante tanto la fidelidad del proceso de replicación del DNA como la eficacia de los mecanismos de reparación del

mismo. La gran cantidad de enzimas implicadas en estos procesos, entre las que destacan las DNA polimerasas, da cuenta de su relevancia. La integridad del genoma va a depender en gran medida de la regulación de las DNA polimerasas, su organización y coordinación. En los últimos años ha aumentado en número de estudios que relacionan diversas enfermedades con alteraciones en las polimerasas de diferentes familias (revisado en Sweasy et al., 2006). Sin embargo, las isoformas y variaciones de la DNA polimerasa Pol β siguen siendo las más caracterizadas (Bhattacharyya et al., 1997; Lang et al., 2004; Stracevic, et al., 2004; Dalal et al., 2005; Sweasy et al., 2005).

A lo largo del capítulo 6 de esta Tesis Doctoral hemos caracterizado bioquímicamente polimorfismos simples de Pol λ (T221P, T458R, S463T y R487W), así como dos variantes descubiertas en bases de datos asociadas a cáncer (T221S y S222F). Al comenzar el proyecto sobre estas variantes, en la base de datos se encontraba también el polimorfismo R57W (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?geneId=27343), que por problemas de solubilidad no pudo ser purificado y caracterizado. El cambio de la Arg⁵⁷ a Trp provoca un descenso drástico en la solubilidad de la proteína por lo que podemos prever la importancia de este residuo en la estructura y función de Pol λ . Debemos tener además en cuenta que esa arginina se encuentra en el dominio BCRT, muy importante durante la reparación de roturas de doble cadena mediante NHEJ. La Arg⁵⁷ es uno de los 10 aminoácidos conservados en el BRCT de las 3 polimerasas de la Familia X que lo poseen: Pol λ , Pol μ y TdT (DeRose et al., 2007; Mueller et al., 2008). La caracterización de este polimorfismo *in vivo* aportaría datos muy interesantes sobre su relevancia, y la del dominio BRCT de Pol λ , en la función de esta polimerasa.

La caracterización realizada sobre estas variantes demuestra que todas poseen capacidad de polimerización, una síntesis distributiva en sustratos tipo molde/iniciador que se vuelve más procesiva en *gaps* de pequeño tamaño y que su capacidad de formar complejos estables E:DNA no se ve alterada. Además insertan el nucleótido correcto frente a la base molde en sustratos tipo GAP1P y mantienen su actividad dRP liasa. En algunos casos, su capacidad de reparación de roturas de doble cadena mediante NHEJ se ve afectada cuando los extremos de DNA son complementarios en 3 pb (T221S y R487W). Sin embargo, en un contexto óptimo de polimerización (con 4 pb de complementariedad y en presencia de iones Mn²⁺) todas las variantes reparan la rotura de manera fiel. Su comportamiento en cuanto a la tolerancia del 5FU en el DNA y a la incorporación del 5-FdUTP en el mismo, no difiere de la variante más común. En cuanto a la tolerancia al daño causado por la presencia de 8oxoG en el DNA, todas las variantes estudiadas presentan el mismo comportamiento que Pol λ , incorporando dA y dC en una proporción 1:1. Sin embargo, llama la atención la diferencia existente en la extensión de los pares 8oxoG:dA y 8oxoG:dC formados. El polimorfismo T221P extiende los pares dG:dC y 8oxoG:dA con eficiencias muy similares y superior a la del par 8oxoG:dC. Las variantes T221S y S222F extienden de la misma manera el par correcto dG:dC que los pares

8oxoG:dA y 8oxoG:dC. Lo mismo ocurre con el polimorfismo T458R. El par correcto dG:dC es el peor extendido por S463T por lo que este polimorfismo es más propenso a fijar la base dañada en el DNA al preferir la extensión de los pares que la contienen (8oxoG:dA y 8oxoG:dC). Por último, el que presenta un comportamiento más alejado de Pol λ de los polimorfismos analizados, R487W, prefiere la extensión del par 8oxoG:dA a la de los pares 8oxoG:dC y dG:dC.

La gran cantidad de estructuras cristalográficas disponibles de Pol β en diferentes complejos con la base modificada 8oxoG, nos ayuda a comprender el comportamiento observado en las variantes de Pol λ . Al estar presente en el DNA como base molde, el 8oxoG puede observarse tanto en su conformación *syn* como *anti*, quedando estabilizado en ambos casos por la Arg²⁸³ de Pol β (Batra et al., 2012). La conservación de este residuo en Pol λ (Arg⁵¹⁷) y su importancia en el ciclo catalítico (Bebenek et al., 2008; Brown, Pack, et al., 2010), nos hacen pensar que Pol λ también es capaz de estabilizar el 8oxoG como base molde en ambas conformaciones, permitiendo la inserción de dA y dC en proporción 1:1. Pol β es capaz de extender los pares formados 8oxoG:dA y 8oxoG:dC tan eficientemente como el par correcto dG:dC y 1000 veces mejor que el par incorrecto dG:dA. Esto pone de manifiesto la capacidad de Pol β para acomodar el 8oxoG apareado con el extremo del iniciador en su centro activo. Sin embargo, las estructuras cristalográficas con el par 8oxoG:dA presenta diferencias respecto al par correcto dG:dC. En un complejo binario E:DNA donde el extremo del iniciador está correctamente apareado, la Arg²⁵⁴ forma un puente salino con el Asp²⁵⁶, además de contactar con otros residuos (**Figura 97A y B**). En presencia del nucleótido, se produce un ligero movimiento de las cadenas laterales de los aminoácidos de forma que la Arg²⁵⁴ sigue estableciendo los mismos contactos con los residuos anteriores pero ahora contacta además con el extremo del iniciador. Cuando el par de bases a extender es 8oxoG:dA, encontramos que tanto en el complejo binario como en el ternario, la Arg²⁵⁴ interacciona con la base dA del iniciador (**Figura 97D y E**). Cabe también señalar que el Asp²⁵⁶ interacciona con esta misma base en el complejo ternario a diferencia de lo que ocurre en un par correcto. Estos residuos y contactos se conservan de nuevo en Pol λ cuando el par de bases a extender es un par de bases de Watson-Crick, por lo que podríamos esperar que ante un par de bases 8oxoG:dA las interacciones también se conserven. La eficiencia de la extensión de los pares 8oxoG:dA y 8oxoG:dC respecto a dG:dC puede verse alterada en las diferentes isoformas de Pol λ por la alteración estructural que puedan suponer cada uno de los cambios presentes en las variantes.

La estructura tridimensional de Pol β en complejo ternario con 8oxodGTP libre presenta como base molde dA. La incapacidad de obtener una cristal cuya base molde sea dC pone de manifiesto que en solución la conformación *syn*-8oxodGTP es la única compatible con el centro activo de la polimerasa y con una catálisis eficiente (Batra et al., 2010). Todas las variantes de Pol λ presentan un mismo comportamiento ante la inserción de 8oxodGTP en el DNA, salvo el polimorfismo T458R. El

cambio de Thr por Arg provoca una alteración de los contactos que establece este residuo, lo que puede conllevar a la diferencia de comportamiento observado respecto a la inserción de 8oxodGTP.

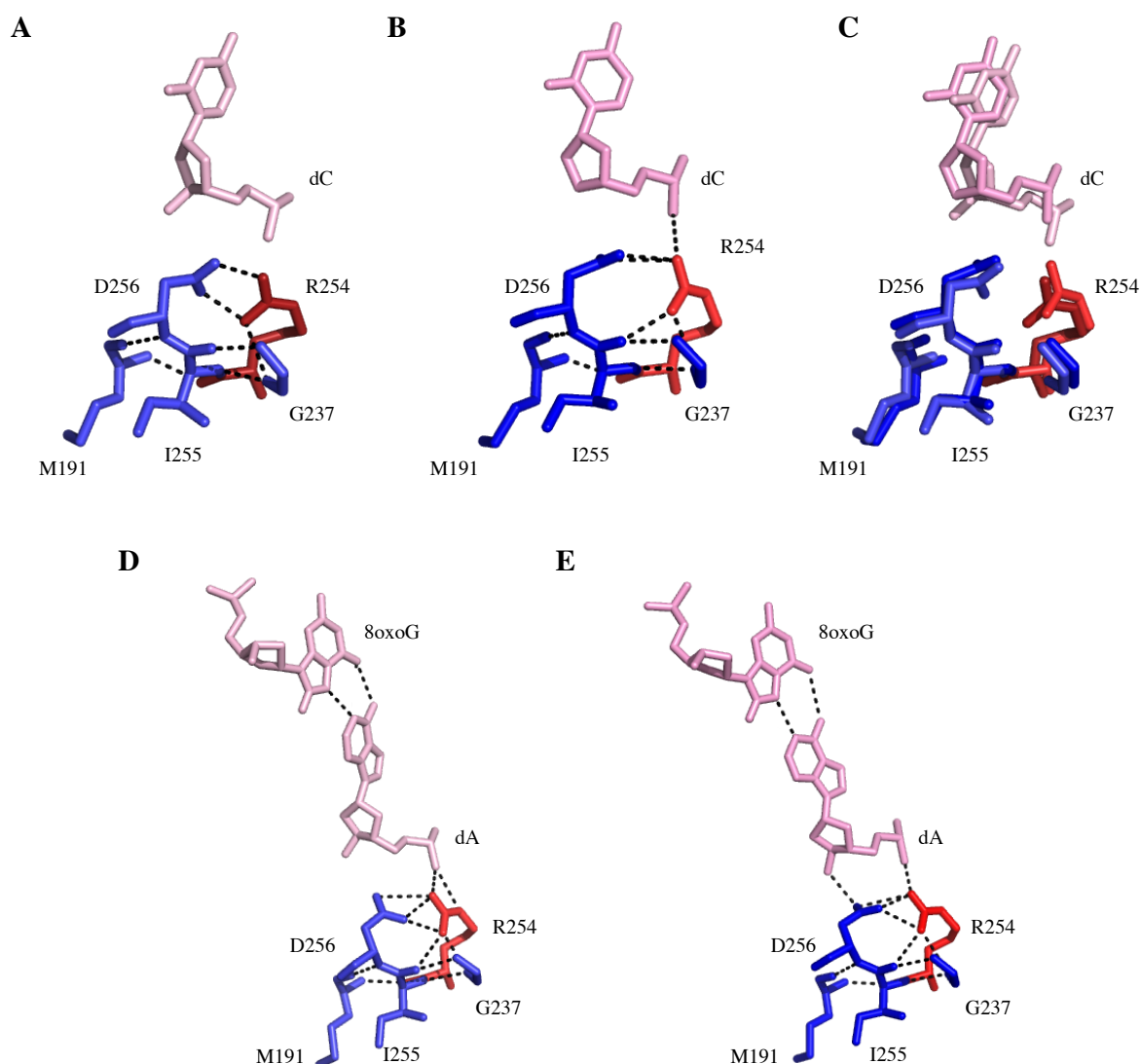


Figura 97. Interacciones de la Arg²⁵⁴ y el Asp²⁵⁶ de Polβ. Representación en *sticks* de las interacciones entre los residuos Arg²⁵⁴, Asp²⁵⁶, Met¹⁹¹, Gly²³⁷ e Ile²⁵⁵ de Polβ. Se indica el extremo del iniciador en rosa. **A.** Complejo binario (PDB id 1BPX) **B.** Complejo ternario (PDB id 1BPY) **C.** Superposición de A y B observándose el cambio conformacional de los residuos. **D.** Complejo binario donde el par de bases a extender es 8oxoG:dA (PDB id 3RJG) **E.** Complejo ternario donde el par de bases a extender es 8oxoG:dA (PDB id 3RJH)

Ninguno de los polimorfismos estudiados se encuentra en el centro activo de Polλ. ¿Cómo es posible que alteraciones tan distantes al núcleo catalítico de la polimerasa puedan tener consecuencias sobre su fidelidad? Para que la reacción de polimerización tenga lugar se debe dar el correcto posicionamiento de los elementos implicados en ella: enzima, DNA, dNTP y los iones metálicos. Los residuos de la polimerasa establecen una compleja red de interacciones que determinan su correcta conformación para la catálisis. Residuos alejados del centro activo pueden estar implicados en el posicionamiento del DNA y de los residuos directamente implicados en la catálisis. Por tanto,

pequeños cambios locales alejados del núcleo catalítico de la polimerasa podrían repercutir en estos factores provocando una disminución de la eficiencia catalítica o de la fidelidad de la reacción.

Mención aparte requiere el polimorfismo R487W, que ve afectados sus parámetros cinéticos. La posición de la Arg⁴⁸⁷ al inicio de la lámina β5 y las interacciones que establece con residuos situados en láminas β adyacentes en el dominio *palma*, sugieren un papel importante de este residuo en la arquitectura de dicho dominio. Además la Arg⁴⁸⁷ se encuentra en la misma lámina β que uno de los aspárticos catalíticos (Asp⁴⁹⁰) y adyacente a la Arg⁴⁸⁸. Ésta en complejo E:DNA interacciona con los residuos Val⁴³⁰, Asp⁴⁹⁰ y con el extremos del iniciador (Figura 98). La llegada del nucleótido provoca un cambio conformacional en la Arg⁴⁸⁸ y el Asp⁴⁹⁰ de manera que ahora la Arg⁴⁸⁸ solo mantiene la interacción con la Val⁴³⁰ (Figura 98). El cambio de Arg a Trp en la posición 487 podría alterar la conformación de los residuos adyacentes distorsionando la estructura de esa región e impidiendo las correctas interacciones entre los residuos catalíticos y sus cambios conformacionales. La distorsión de la arquitectura del dominio *palma*, explicaría los resultados obtenidos sobre la alteración de los parámetros cinéticos del polimorfismo R487W. La Arg⁴⁸⁷ de Polλ forma parte de una región expuesta y cargada, por lo que no podemos descartar su implicación *in vivo* en interacciones con otras proteínas que regulen la actividad de Polλ.

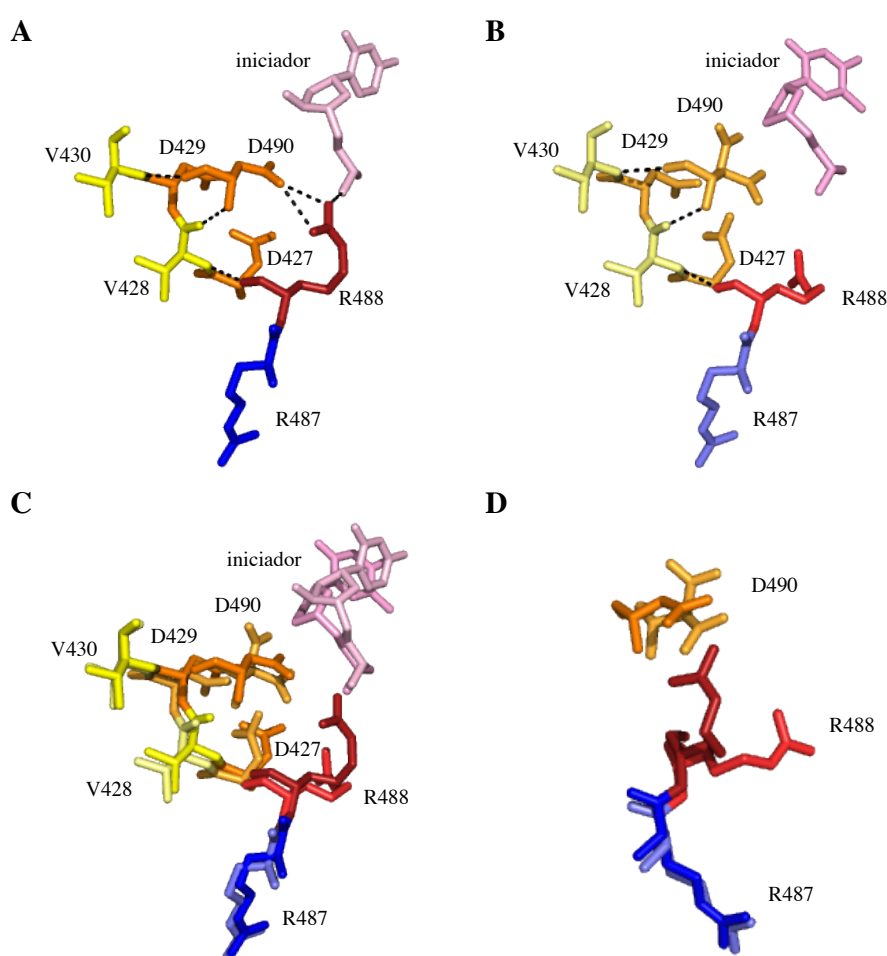


Figura 98. Interacciones de la Arg⁴⁸⁸ y los Asp catalíticos de Polλ. Representación en sticks de las interacciones entre los residuos Asp⁴²⁷, Val⁴²⁸, Asp⁴²⁹, Val⁴³⁰, Arg⁴⁸⁸ y Asp⁴⁹⁰. Se indica además la Arg⁴⁸⁷ en azul y el extremo del iniciador en rosa. **A.** Complejo binario (PDB id 1XSL). **B.** Complejo ternario (PDB id 1XSN). **C.** Superposición de A y B observándose el cambio conformacional de los residuos. **D.** Detalle de la superposición de A y B donde se aprecia el cambio de orientación de la Arg⁴⁸⁸ y el Asp⁴⁹⁰.

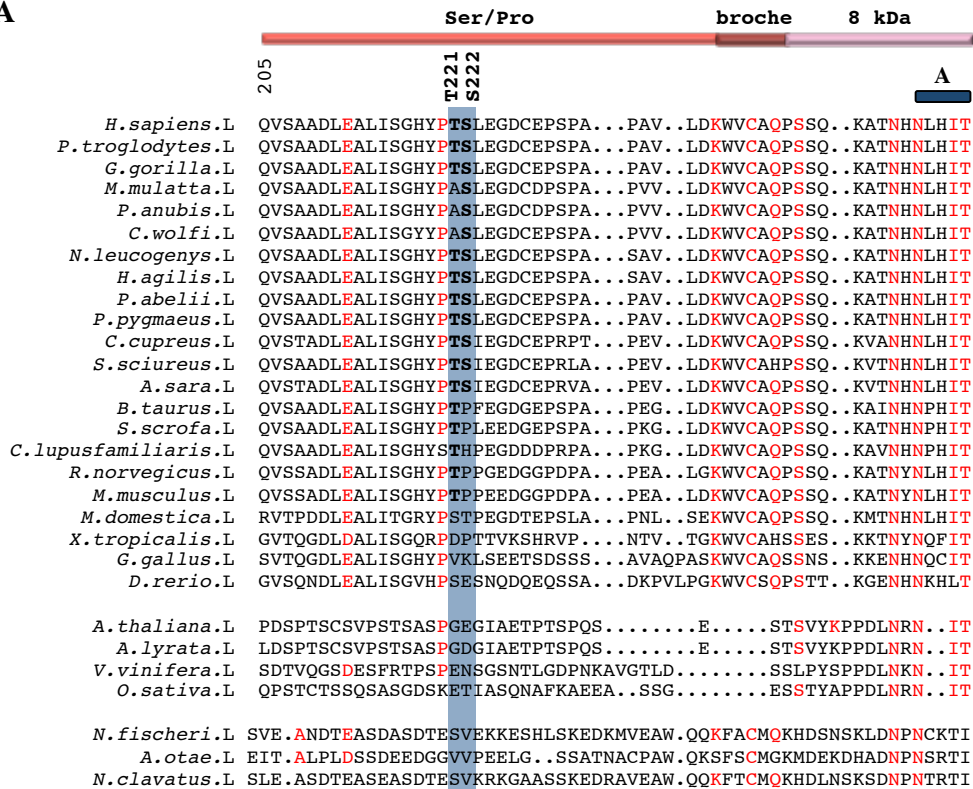
Tanto la Arg⁴⁸⁷ como la Arg⁴⁸⁸ de Polλ se encuentran conservadas en Polβ (Arg²⁵³ y Arg²⁵⁴ respectivamente) (**Figura 99**). Como hemos mencionado anteriormente, la Arg²⁵⁴ de Polβ juega también un papel muy importante en su ciclo catalítico. Por su parte, al igual que en Polλ, la Arg²⁵³ de Polβ se encuentra en un *loop* situado entre las láminas β 4 y 5. A pesar de estar alejado del centro activo de la proteína, se ha descrito la importancia de esta región en la fidelidad de Polβ (Kosa & Sweasy, 1999; Dalal et al., 2004). Llama la atención el grado de conservación de este residuo a lo largo de la evolución: está presente en la DNA polimerasa β de diferentes especies, así como en algunos tipos de plantas. En hongos *lambda-like* también se conserva la secuencia RRXD adyacente al Asp catalítico.

El resto de variantes de Polλ descritas también se encuentran conservadas en la evolución. La Ser⁴⁶³ está presente en Polλ de diferentes especies, en plantas y de nuevo en los hongos *lambda-like*. En Polβ también encontramos este residuo al inicio de su giro entre sus láminas β 3 y 4. Por su parte, el último polimorfismo del dominio *palma*, Thr⁴⁵⁸ se conserva en Polβ pero esta vez, no lo encontramos ni en Polλ de plantas ni en hongos. De hecho, el residuo que se encuentra en esta posición en plantas es una Arg, residuo al que cambia este polimorfismo (T458R).

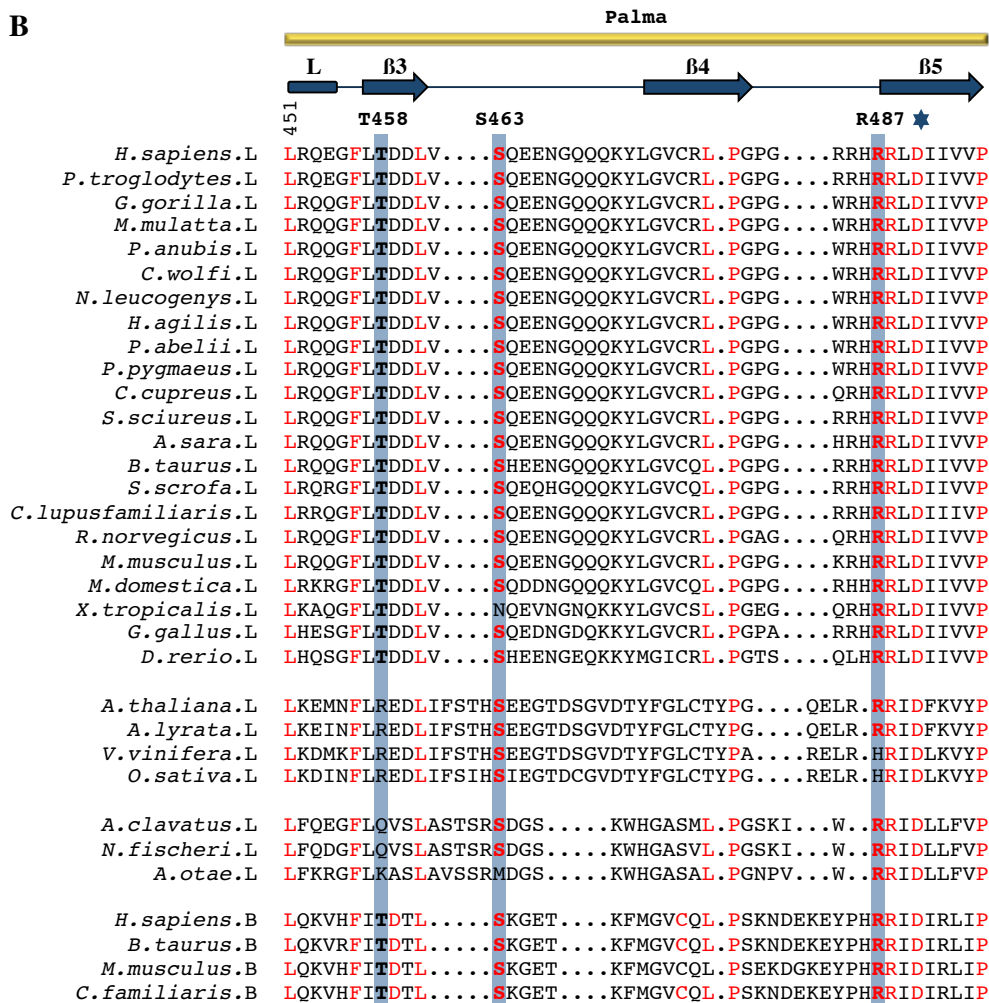
Los polimorfismos y variantes estudiadas en el dominio Ser/Pro no parecen tan conservados a lo largo de la evolución. La Thr²²¹ ni siquiera se conserva en Polλ de las diferentes especies analizadas (**Figura 99**). Tampoco la encontramos en plantas ni en hongos. Por último el grado de conservación de la Ser²²² es aún menor.

Figura 99. Alineamiento múltiple de secuencia de diferentes especies de las regiones de Polλ que contienen las isoformas estudiadas. Los números de la parte superior corresponden a la posición relativa de los residuos en relación al extremos N-terminal de Polλ, el dominio de la polimerasa correspondiente y la estructura secundaria en forma de las láminas β (flechas) y hélices α (rectángulos). Se destacan en rojo los aminoácidos más conservados en las diferentes especies. **A.** Se indican en negrita y con fondo azul los residuos T221 y S222 correspondientes a las posiciones de las variantes en el dominio Ser/Pro. **B.** Se indican en negrita y con fondo azul los residuos T458, S463 y R487 correspondientes a las posiciones de las variantes en el dominio *palma*. El asterisco marca la posición del Asp catalítico (D490 en Polλ).

A



B



El análisis comparativo de secuencias a lo largo de la evolución nos da una aproximación de la importancia de cada uno de los residuos en la función de la polimerasa. En los últimos años se ha ampliado el conocimiento de formas alteradas de proteínas de reparación que desemboca en una transformación celular y en procesos cancerígenos (Dalal et al., 2005; Sweasy et al., 2005; Terrados et al., 2009; Capp et al., 2010). El conocimiento de la base genética de estas transformaciones constituye un reto. En este sentido, el proyecto “1000 genomas” ha abierto la puerta al estudio de la relación entre las variaciones de secuencia y la susceptibilidad a padecer una enfermedad. Aunque no se puede afirmar que una sola mutación sea la causa de un proceso de oncogénesis, puede contribuir al aumento de la inestabilidad genómica confiriendo una ventaja de crecimiento a la célula durante su transformación a célula cancerosa. Por tanto, el estudio de los polimorfismos naturales de las proteínas implicadas en reparación es fundamental para el mantenimiento y la estabilidad del genoma.

CONCLUSIONES

1. En ausencia de los factores auxiliares de NHEJ, Pol λ es capaz de reparar roturas de doble cadena en el DNA de manera fiel y eficiente cuando los extremos presentan complementariedad. La eficiencia de la reacción depende del contexto de secuencia y de la presencia del grupo fosfato en el extremo 5' del *gap*.
2. Pol λ es capaz de reconocer y reparar roturas en el DNA aunque la región conectada presente imperfecciones tales como bases desapareadas, bases extra o incluso bases dañadas como 8oxodG, y los *gaps* formados tras la conexión de 4 pb mayores sean de 1 nucleótido.
3. El *nail* de Pol λ presente en su dominio *pulgar*, favorece la estabilización de las bases extra-helicoidales presentes en el DNA molde, siendo más prescindible cuanto mayor es la distancia de estas bases al extremo 3' del iniciador. Pol λ no hace distinción entre estabilizar purinas o pirimidinas.
4. La pérdida del *nail* de Pol λ compromete la eficiencia de la reparación de roturas de doble cadena mediante NHEJ.
5. Gracias a las interacciones del Loop1 con ambos extremos de DNA, Pol λ alcanza su mayor eficiencia durante el mecanismo de NHEJ cuando la conexión entre ambos extremos es de 4 pb. En ausencia del Loop 1 (Pol λ -DL) no se observa una mejor eficiencia en una conexión de NHEJ de 4 pb. El intercambio del Loop 1 de Pol λ por el de Pol μ no confiere a la primera la capacidad de reparar roturas de DNA cuyos extremos no son complementarios, ni de polimerizar de forma independiente de molde.
6. Entre el dominio Ser/Pro de Pol λ y su *core* tipo Pol β existe una región de 5 aminoácidos (WVCAQ), denominada *broche*, presente en Pol μ y TdT pero ausente en Pol β que mantiene la conformación cerrada de Pol λ a lo largo de su ciclo catalítico. Mutantes puntuales en esta región ven afectada su capacidad de polimerización en sustratos de DNA que requieren *scrunching* así como la reparación de roturas por el mecanismo de NHEJ.
7. La introducción del BRCT de Pol μ en Pol λ aumenta su afinidad por extremos de DNA 3' protuberantes como son los intermediarios de las reacciones de NHEJ. Sin embargo, la eficiencia de la reparación de extremos complementarios se ve disminuida por el intercambio de los dominios BRCT. Por otra parte, la habilidad de reparar roturas con extremos no complementarios no es adquirida por Pol λ . Las proteínas quiméricas estudiadas (Pol λ (BRCT μ) y Pol λ (BRCT μ +YACQR μ)) demuestran además que la región del *broche* juega un papel muy importante en la unión de este dominio con el *core* de la polimerasa.
8. Hemos identificado 4 variantes polimórficas naturales de Pol λ y 2 isoformas asociadas a cáncer cuya caracterización bioquímica revela que mantienen su capacidad de unión al DNA, el reconocimiento del grupo 5'P y su actividad dRP liasa. A pesar de llevar a cabo una reparación fiel en presencia de Mn²⁺ y complementariedad de 4 pb, las isoformas T221S y R487W presentan una

menor eficiencia en la reparación mediante NHEJ cuando la complementariedad de los extremos es de 3 pb. Además, estas variantes presentan una tolerancia al 8oxodGTP alterada y diferencias en la extensión de pares formados por 8oxodG:dC y 8oxodG:dA.

9. El polimorfismo natural R487W presenta unos parámetros cinéticos muy reducidos, probablemente como consecuencia de la alteración estructural que el cambio de Arg a Trp provoca en una región tan importante para la catálisis como el subdominio *palma*. A pesar de esta alteración, es capaz de tolerar la presencia de 5-FU en el DNA, así como de 8oxoG, y de reparar de forma fiel y eficaz roturas de doble cadena en el DNA en condiciones óptimas: complementariedad de 4 pb de los extremos de DNA y presencia de iones Mn^{2+} .

BIBLIOGRAFÍA

- Abbotts J, SenGupta DN, Zmudzka B, Widen SG, Notario V, W. S. (1988). Expression of human DNA polymerase beta in *Escherichia coli* and characterization of the recombinant enzyme. *Biochemistry*.
- Ahn, J., Werneburg, B. G., & Tsai, M. D. (1997). DNA polymerase beta: structure-fidelity relationship from Pre-steady-state kinetic analyses of all possible correct and incorrect base pairs for wild type and R283A mutant. *Biochemistry*, 36(5), 1100–7.
- Ahnesorg, P., Smith, P., & Jackson, S. P. (2006). XLF interacts with the XRCC4-DNA ligase IV complex to promote DNA nonhomologous end-joining. *Cell*, 124(2), 301–13.
- Aidan J. Doherty, L. C. S. and C. P. P. (1996). The helix-hairpin-helix DNA-binding motif: a structural basis for non-sequence-specific recognition of DNA. *Nucleic acids research*, 24(13), 2488–97.
- Andrade, P., Martín, M. J., Juárez, R., López de Saro, F., & Blanco, L. (2009). Limited terminal transferase in human DNA polymerase mu defines the required balance between accuracy and efficiency in NHEJ. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(38), 16203–8.
- Aoufouchi, S., Flatter, E., Dahan, a, Faili, a, Bertocci, B., Storck, S., Delbos, F., et al. (2000). Two novel human and mouse DNA polymerases of the polX family. *Nucleic acids research*, 28(18), 3684–93.
- Arana, M. E., Seki, M., Wood, R. D., Rogozin, I. B., & Kunkel, T. a. (2008). Low-fidelity DNA synthesis by human DNA polymerase theta. *Nucleic acids research*, 36(11), 3847–56.
- Aza, a., Martin, M. J., Juarez, R., Blanco, L., & Terrados, G. (2013). DNA expansions generated by human Pol on iterative sequences. *Nucleic Acids Research*, 41(1), 253–263.
- BHATTACHARYYA, Nandan and BANERJEE, S. (1997). A variant of DNA polymerase β acts as a dominant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94(September), 10324–10329.
- Batra, V. K., Beard, W. a, Hou, E. W., Pedersen, L. C., Prasad, R., & Wilson, S. H. (2010). Mutagenic conformation of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-dGTP in the confines of a DNA polymerase active site. *Nature structural & molecular biology*, 17(7), 889–90.
- Batra, V. K., Shock, D. D., Beard, W. a, McKenna, C. E., & Wilson, S. H. (2012). Binary complex crystal structure of DNA polymerase β reveals multiple conformations of the templating 8-oxoguanine lesion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(1), 113–8.
- Beard, W. A., & Wilson, S. H. (1998). Structural insights into DNA polymerase beta fidelity: hold tight if you want it right. *Chemistry & biology*, 5(1), R7–13. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9479474>
- Beard, W. a, & Wilson, S. H. (2000). Structural design of a eukaryotic DNA repair polymerase: DNA polymerase beta. *Mutation research*, 460(3-4), 231–44.
- Bebenek K, Tissier A, Frank EG, McDonald JP, Prasad R, Wilson SH, Woodgate R, K. T. (2001). 5'-Deoxyribose phosphate lyase activity of human DNA polymerase iota in vitro. *Science*.

- Bebenek, K., Garcia-Diaz, M., Blanco, L., & Kunkel, T. a. (2003a). The frameshift infidelity of human DNA polymerase lambda. Implications for function. *The Journal of biological chemistry*, 278(36), 34685–90.
- Bebenek, K., Garcia-Diaz, M., Blanco, L., & Kunkel, T. a. (2003b). The frameshift infidelity of human DNA polymerase lambda. Implications for function. *The Journal of biological chemistry*, 278(36), 34685–90.
- Bebenek, K., Garcia-Diaz, M., Foley, M. C., Pedersen, L. C., Schlick, T., & Kunkel, T. a. (2008). Substrate-induced DNA strand misalignment during catalytic cycling by DNA polymerase lambda. *EMBO reports*, 9(5), 459–64.
- Bebenek, K., Garcia-Diaz, M., Patishall, S. R., & Kunkel, T. a. (2005). Biochemical properties of *Saccharomyces cerevisiae* DNA polymerase IV. *The Journal of biological chemistry*, 280(20), 20051–8.
- Bebenek, K., Garcia-Diaz, M., Zhou, R.-Z., Povirk, L. F., & Kunkel, T. a. (2010). Loop 1 modulates the fidelity of DNA polymerase lambda. *Nucleic acids research*, 38(16), 5419–31.
- Bebenek, K., & Kunkel, T. A. (2003). FUNCTIONS OF DNA POLYMERASES. *Advanced in protein chemistry*, 69, 137–165.
- Beckman, R. a, Mildvan, a S., & Loeb, L. a. (1985). On the fidelity of DNA replication: manganese mutagenesis in vitro. *Biochemistry*, 24(21), 5810–7.
- Beese, L. S., & Steitz, T. a. (1991). Structural basis for the 3'-5' exonuclease activity of *Escherichia coli* DNA polymerase I: a two metal ion mechanism. *The EMBO journal*, 10(1), 25–33.
- Bennett RA, Wilson DM 3rd, Wong D, D. B. (1997). Interaction of human apurinic endonuclease and DNA polymerase beta in the base excision repair pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Bertocci, B., De Smet, A., Flatter, E., Dahan, A., Bories, J.-C., Landreau, C., Weill, J.-C., et al. (2002a). Cutting edge: DNA polymerases mu and lambda are dispensable for Ig gene hypermutation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 168(8), 3702–6.
- Bertocci, B., De Smet, A., Flatter, E., Dahan, A., Bories, J.-C., Landreau, C., Weill, J.-C., et al. (2002b). Cutting edge: DNA polymerases mu and lambda are dispensable for Ig gene hypermutation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 168(8), 3702–6.
- Bertocci, B., De Smet, A., Weill, J.-C., & Reynaud, C.-A. (2006). Nonoverlapping functions of DNA polymerases mu, lambda, and terminal deoxynucleotidyltransferase during immunoglobulin V(D)J recombination in vivo. *Immunity*, 25(1), 31–41.
- Biertümpfel, C., Zhao, Y., Kondo, Y., Ramón-Maiques, S., Gregory, M., Lee, J. Y., Masutani, C., et al. (2010). Structure and mechanism of human DNA polymerase eta. *Nature*, 465(7301), 1044–8.
- Bjursell G, S. L. (1980). Control of nucleotide pools in mammalian cells. *Antibiot Chemother*.
- Blanca, G., Shevelev, I., Ramadan, K., Villani, G., Spadari, S., Hübscher, U., & Maga, G. (2003). Human DNA polymerase lambda diverged in evolution from DNA polymerase beta toward specific Mn(++) dependence: a kinetic and thermodynamic study. *Biochemistry*, 42(24), 7467–76.

- Blanco, L., & Salas, M. (1984). Characterization and purification of a phage phi 29-encoded DNA polymerase required for the initiation of replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81(17), 5325–9.
- Bollum, F. J. (1960). Oligodeoxyribonucleotide primers for Calf thymus polymerase. *Journal of molecular biology*, 235(5), 18–20.
- Bork P, Hofmann K, Bucher P, Neuwald AF, Altschul SF, K. E. (1997). A superfamily of conserved domains in DNA damage-responsive cell cycle checkpoint proteins. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 11, 68–76.
- Boudsocq, F., Kokoska, R. J., Plosky, B. S., Vaisman, A., Ling, H., Kunkel, T. a, Yang, W., et al. (2004). Investigating the role of the little finger domain of Y-family DNA polymerases in low fidelity synthesis and translesion replication. *The Journal of biological chemistry*, 279(31), 32932–40.
- Boulé, J. B., Rougeon, F., & Papanicolaou, C. (2001). Terminal deoxynucleotidyl transferase indiscriminately incorporates ribonucleotides and deoxyribonucleotides. *The Journal of biological chemistry*, 276(33), 31388–93.
- Braithwaite, D. K., & Ito, J. (1993). Compilation, alignment, and phylogenetic relationships of DNA polymerases. *Nucleic Acids Research*
- Braithwaite, E. K., Kedar, P. S., Lan, L., Polosina, Y. Y., Asagoshi, K., Poltoratsky, V. P., Horton, J. K., et al. (2005). DNA polymerase lambda protects mouse fibroblasts against oxidative DNA damage and is recruited to sites of DNA damage/repair.
- Braithwaite, E. K., Prasad, R., Shock, D. D., Hou, E. W., Beard, W. a, & Wilson, S. H. (2005). DNA polymerase lambda mediates a back-up base excision repair activity in extracts of mouse embryonic fibroblasts. *The Journal of biological chemistry*, 280(18), 18469–75.
- Brissett, N. C., Pitcher, R. S., Juarez, R., Picher, A. J., Green, A. J., Dafforn, T. R., Fox, G. C., et al. (2007). Structure of a NHEJ polymerase-mediated DNA synaptic complex. *Science (New York, N.Y.)*, 318(5849), 456–9.
- Brown, J. a, Duym, W. W., Fowler, J. D., & Suo, Z. (2007). Single-turnover kinetic analysis of the mutagenic potential of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine during gap-filling synthesis catalyzed by human DNA polymerases lambda and beta. *Journal of molecular biology*, 367(5), 1258–69.
- Brown, J. a, Fiala, K. a, Fowler, J. D., Sherrer, S. M., Newmister, S. a, Duym, W. W., & Suo, Z. (2010). A novel mechanism of sugar selection utilized by a human X-family DNA polymerase. *Journal of molecular biology*, 395(2), 282–90.
- Brown, J. a, Pack, L. R., Sherrer, S. M., Kshetry, A. K., Newmister, S. a, Fowler, J. D., Taylor, J.-S., et al. (2010). Identification of critical residues for the tight binding of both correct and incorrect nucleotides to human DNA polymerase λ . *Journal of molecular biology*, 403(4), 505–15.
- Burgers, P. M. J. (2008). Polymerase dynamics at the eukaryotic DNA replication fork. *The Journal of biological chemistry*, 284(7), 4041–5.

- Burgers, P. M., Koonin, E. V., Bruford, E., Blanco, L., Burtis, K. C., Christman, M. F., Copeland, W. C., et al. (2001). Eukaryotic DNA polymerases: proposal for a revised nomenclature. *The Journal of biological chemistry*, 276(47), 43487–90.
- Caldecott, K. W., Aoufouchi, S., Johnson, P., & Shall, S. (1996). XRCC1 polypeptide interacts with DNA polymerase beta and possibly poly (ADP-ribose) polymerase, and DNA ligase III is a novel molecular “nick-sensor” in vitro. *Nucleic acids research*, 24(22), 4387–94.
- Callebaut, I., & Mornon, J.-P. (1997a). From BRCA1 to RAP1: a widespread BRCT module closely associated with DNA repair. *FEBS Letters*, 400(1), 25–30.
- Callebaut, I., & Mornon, J.-P. (1997b). From BRCA1 to RAP1: a widespread BRCT module closely associated with DNA repair. *FEBS Letters*, 400(1), 25–30.
- Canitrot, Y., Hoffmann, J. S., Calsou, P., Hayakawa, H., Salles, B., & Cazaux, C. (2000). Nucleotide excision repair DNA synthesis by excess DNA polymerase beta: a potential source of genetic instability in cancer cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 14(12), 1765–74.
- Cann, I. K., & Ishino, Y. (1999). Archaeal DNA replication: identifying the pieces to solve a puzzle. *Genetics*, 152(4), 1249–67.
- Capp, J.-P., Boudsocq, F., Bergoglio, V., Trouche, D., Cazaux, C., Blanco, L., Hoffmann, J.-S., et al. (2010). The R438W polymorphism of human DNA polymerase lambda triggers cellular sensitivity to camptothecin by compromising the homologous recombination repair pathway. *Carcinogenesis*, 31(10), 1742–7.
- Carrodegua, A., Theis, K., Bogenhagen, D. F., Kisker, C., Brook, S., & York, N. (2001). Crystal Structure and Deletion Analysis Show that the Accessory Subunit of Mammalian DNA Polymerase β , Pol β , Functions as a Homodimer. *Molecular Cell*, 7, 43–54.
- Chagovetz, a M., Sweasy, J. B., & Preston, B. D. (1997). Increased activity and fidelity of DNA polymerase beta on single-nucleotide gapped DNA. *The Journal of biological chemistry*, 272(44), 27501–4.
- Chappell, C., Hanakahi, L. a, Karimi-Busheri, F., Weinfeld, M., & West, S. C. (2002). Involvement of human polynucleotide kinase in double-strand break repair by non-homologous end joining. *The EMBO journal*, 21(11), 2827–32.
- Chen, L., Trujillo, K., Sung, P., & Tomkinson, a E. (2000). Interactions of the DNA ligase IV-XRCC4 complex with DNA ends and the DNA-dependent protein kinase. *The Journal of biological chemistry*, 275(34), 26196–205.
- Chyan, Y. J., Ackerman, S., Shepherd, N. S., McBride, O. W., Widen, S. G., Wilson, S. H., & Wood, T. G. (1994). The human DNA polymerase beta gene structure. Evidence of alternative splicing in gene expression. *Nucleic acids research*, 22(14), 2719–25.
- Coll, M., Saal, D., Frederick, C. A., Aymami, J., Rich, A., & Wang, A. H. (1989). Effects of 5-fluorouracil/guanine wobble base pairs in Z-DNA: molecular and crystal structure of d(CGCGFG). *Nucleic acids research*, 17(3), 911–23.

- da Costa, L. T., Liu, B., el-Deiry, W., Hamilton, S. R., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., Markowitz, S., et al. (1995). Polymerase delta variants in RER colorectal tumours. *Nature genetics*, 9(1), 10–1.
- Dalal, S., Hile, S., Eckert, K. A., Sun, K., Starcevic, D., & Sweasy, J. B. (2005). Prostate-cancer-associated I260M variant of DNA polymerase beta is a sequence-specific mutator. *Biochemistry*, 44(48), 15664–73.
- Dalal, S., Kosa, J. L., & Sweasy, J. B. (2004). The D246V Mutant of DNA Polymerase β Misincorporates Nucleotides. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 279(1), 577–584.
- Daley, J. M., Laan, R. L. V., Suresh, A., & Wilson, T. E. (2005). DNA joint dependence of pol X family polymerase action in nonhomologous end joining. *The Journal of biological chemistry*, 280(32), 29030–7.
- Davis, B. J., Havener, J. M., & Ramsden, D. a. (2008). End-bridging is required for pol mu to efficiently promote repair of noncomplementary ends by nonhomologous end joining. *Nucleic acids research*, 36(9), 3085–94.
- DeRose, E. F., Clarkson, M. W., Gilmore, S. a, Galban, C. J., Tripathy, A., Havener, J. M., Mueller, G. a, et al. (2007). Solution structure of polymerase mu's BRCT Domain reveals an element essential for its role in nonhomologous end joining. *Biochemistry*, 46(43), 12100–10.
- Delarue, M., Boulé, J. B., Lescar, J., Expert-Bezançon, N., Jourdan, N., Sukumar, N., Rougeon, F., et al. (2002). Crystal structures of a template-independent DNA polymerase: murine terminal deoxynucleotidyltransferase. *The EMBO journal*, 21(3), 427–39.
- Derosé, E. F., Clarkson, M. W., Gilmore, S. A., Galban, C. J., Tripathy, A., Havener, J. M., Mueller, G. A., et al. (2007). Solution structure of polymerase mu's BRCT Domain reveals an element essential for its role in nonhomologous end joining. *Biochemistry*, 46(43), 12100–12110.
- Dimitriadis, E. K., Prasad, R., Vaske, M. K., Chen, L., Tomkinson, A. E., Lewis, M. S., & Wilson, S. H. (1998). Thermodynamics of human DNA ligase I trimerization and association with DNA polymerase beta. *The Journal of biological chemistry*, 273(32), 20540–50.
- Dogliotti E, Fortini P, Pascucci B, P. E. (2001). The mechanism of switching among multiple BER pathways. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*.
- Domínguez, O., Ruiz, J. F., Laín de Lera, T., García-Díaz, M., González, M. a, Kirchhoff, T., Martínez-A, C., et al. (2000a). DNA polymerase mu (Pol mu), homologous to TdT, could act as a DNA mutator in eukaryotic cells. *The EMBO journal*, 19(7), 1731–42.
- Domínguez, O., Ruiz, J. F., Laín de Lera, T., García-Díaz, M., González, M. a, Kirchhoff, T., Martínez-A, C., et al. (2000b). DNA polymerase mu (Pol mu), homologous to TdT, could act as a DNA mutator in eukaryotic cells. *The EMBO journal*, 19(7), 1731–42.
- Donigan, K. a, Sun, K.-W., Nemec, A. a, Murphy, D. L., Cong, X., Northrup, V., Zelterman, D., et al. (2012). Human POLB Gene Is Mutated in High Percentage of Colorectal Tumors. *The Journal of biological chemistry*, 287(28), 23830–9.
- Doublíé, S., Sawaya, M. R., & Ellenberger, T. (1999). An open and closed case for all polymerases. *Structure (London, England : 1993)*, 7(2), R31–5.

- Enjuanes, A., Benavente, Y., Bosch, F., Martín-Guerrero, I., Colomer, D., Pérez-Alvarez, S., Reina, O., et al. (2008). Genetic variants in apoptosis and immunoregulation-related genes are associated with risk of chronic lymphocytic leukemia. *Cancer research*, 68(24), 10178–86.
- Esteban, V., Martin, M. J., & Blanco, L. (2013). The BRCT domain and the specific loop 1 of human Pol μ are targets of Cdk2/cyclin A phosphorylation. *DNA repair*, 6, 1–11.
- Fan, W., & Wu, X. (2004). DNA polymerase lambda can elongate on DNA substrates mimicking non-homologous end joining and interact with XRCC4-ligase IV complex. *Biochemical and biophysical research communications*, 323(4), 1328–33.
- Fiala, K. a, Duym, W. W., Zhang, J., & Suo, Z. (2006). Up-regulation of the fidelity of human DNA polymerase lambda by its non-enzymatic proline-rich domain. *The Journal of biological chemistry*, 281(28), 19038–44.
- Flohr, T., Dai, J. C., Büttner, J., Popanda, O., Hagmüller, E., & Thielmann, H. W. (1999). Detection of mutations in the DNA polymerase delta gene of human sporadic colorectal cancers and colon cancer cell lines. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 80(6), 919–29.
- Foley, M. C., Arora, K., & Schlick, T. (2006). Sequential side-chain residue motions transform the binary into the ternary state of DNA polymerase lambda. *Biophysical journal*, 91(9), 3182–95.
- Fortini, P. (2003). 8-Oxoguanine DNA damage: at the crossroad of alternative repair pathways. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 531(1-2), 127–139.
- Frouin, I., Toueille, M., Ferrari, E., Shevelev, I., & Hübscher, U. (2005). Phosphorylation of human DNA polymerase lambda by the cyclin-dependent kinase Cdk2/cyclin A complex is modulated by its association with proliferating cell nuclear antigen. *Nucleic acids research*, 33(16), 5354–61.
- Gan, G. N., & John P Wittschieben1, Birgitte Ø Wittschieben1*, R. D. W. (2008). DNA polymerase zeta (pol zeta) in higher eukaryotes. *Cell Research*.
- Garcia-Diaz, M., Bebenek, K., Gao, G., Pedersen, L. C., London, R. E., & Kunkel, T. a. (2005). Structure-function studies of DNA polymerase lambda. *DNA repair*, 4(12), 1358–67.
- Garcia-Diaz, M., Bebenek, K., Krahn, J. M., Blanco, L., Kunkel, T. a, & Pedersen, L. C. (2004). A structural solution for the DNA polymerase lambda-dependent repair of DNA gaps with minimal homology. *Molecular cell*, 13(4), 561–72.
- Garcia-Diaz, M., Bebenek, K., Krahn, J. M., Kunkel, T. a, & Pedersen, L. C. (2005). A closed conformation for the Pol lambda catalytic cycle. *Nature structural & molecular biology*, 12(1), 97–8.
- Garcia-Diaz, M., Bebenek, K., Krahn, J. M., Pedersen, L. C., & Kunkel, T. a. (2006). Structural analysis of strand misalignment during DNA synthesis by a human DNA polymerase. *Cell*, 124(2), 331–42.
- Garcia-Diaz, M., Bebenek, K., Krahn, J. M., Pedersen, L. C., & Kunkel, T. a. (2007). Role of the catalytic metal during polymerization by DNA polymerase lambda. *DNA repair*, 6(9), 1333–40.

- García-Díaz, M., Bebenek, K., Larrea, A. a, Havener, J. M., Perera, L., Krahn, J. M., Pedersen, L. C., et al. (2009). Template strand scrunching during DNA gap repair synthesis by human polymerase lambda. *Nature structural & molecular biology*, 16(9), 967–72.
- Garcin, E. D., Hosfield, D. J., Desai, S. A., Haas, B. J., Björas, M., Cunningham, R. P., & Tainer, J. A. (2008). DNA apurinic-apyrimidinic site binding and excision by endonuclease IV. *Nature structural & molecular biology*, 15(5), 515–22.
- García-Díaz, M., Bebenek, K., Kunkel, T. a, & Blanco, L. (2001). Identification of an intrinsic 5'-deoxyribose-5-phosphate lyase activity in human DNA polymerase lambda: a possible role in base excision repair. *The Journal of biological chemistry*, 276(37), 34659–63.
- García-Díaz, M., Domínguez, O., López-Fernández, L. a, de Lera, L. T., Saníger, M. L., Ruiz, J. F., Párraga, M., et al. (2000). DNA polymerase lambda (Pol lambda), a novel eukaryotic DNA polymerase with a potential role in meiosis. *Journal of molecular biology*, 301(4), 851–67.
- García-Díaz, Miguel, Bebenek, K., Sabariego, R., Domínguez, O., Rodríguez, J., Kirchhoff, T., García-Palmero, E., et al. (2002). DNA polymerase lambda, a novel DNA repair enzyme in human cells. *The Journal of biological chemistry*, 277(15), 13184–91.
- García-Escudero, R., García-Díaz, M., Salas, M. L., Blanco, L., & Salas, J. (2003). DNA Polymerase X of African Swine Fever Virus: Insertion Fidelity on Gapped DNA substrates and AP lyase Activity Support a Role in Base Excision Repair of Viral DNA. *Journal of Molecular Biology*, 326(5), 1403–1412.
- González-Barrera, S., Sánchez, A., Ruiz, J. F., Juárez, R., Picher, A. J., Terrados, G., Andrade, P., et al. (2005). Characterization of SpPol4, a unique X-family DNA polymerase in *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic acids research*, 33(15), 4762–74.
- Gottlieb, T. M., & Jackson, P. (1993). The DNA-Dependent Protein Ki for DNA Ends and AssocWbn with Ku Antigen. *Cell*, 72, 131–142.
- Grabarz, A., Barascu, A., Guirouilh-barbat, J., & Lopez, B. S. (2012). Initiation of DNA double strand break repair: signaling and single-stranded resection dictate the choice between homologous recombination, non-homologous end-joining and alternative end-joining. *American journal of cancer research*, 2(3), 249–268.
- Grawunder, U., Wilm, M., Wu, X., Kulesza, P., Wilson, T. E., Mann, M., & Lieber, M. R. (1997). Activity of DNA ligase IV stimulated by complex formation with XRCC4 protein in mammalian cells. *Nature*, 388(July), 3–6.
- Graziewicz, M. a, Longley, M. J., & Copeland, W. C. (2006). DNA polymerase gamma in mitochondrial DNA replication and repair. *Chemical reviews*, 106(2), 383–405.
- Gryk, M. R., Marintchev, A., Maciejewski, M. W., Robertson, A., Wilson, S. H., & Mullen, G. P. (2002). Mapping of the interaction interface of DNA polymerase beta with XRCC1. *Structure*, 10(12), 1709–20.
- Guirouilh-Barbat, J., Rass, E., Plo, I., Bertrand, P., & Lopez, B. S. (2007). Defects in XRCC4 and KU80 differentially affect the joining of distal nonhomologous ends. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(52), 20902–7.

- Guo, Z., Zheng, L., Dai, H., Zhou, M., Xu, H., & Shen, B. (2009). Human DNA polymerase beta polymorphism, Arg137Gln, impairs its polymerase activity and interaction with PCNA and the cellular base excision repair capacity. *Nucleic acids research*, 37(10), 3431–41.
- HEIDELBERGER, C., CHAUDHURI, N. K., DANNEBERG, P., MOOREN, D., GRIESBACH, L., DUSCHINSKY, R., SCHNITZER, R. J., et al. (1957). Fluorinated pyrimidines, a new class of tumour-inhibitory compounds. *Nature*, 179(4561), 663–6.
- Habener, J. F., Vo, C. D., Le, D. B., Gryan, G. P., Ercolani, L., & Wang, A. H. (1988). 5-Fluorodeoxyuridine as an alternative to the synthesis of mixed hybridization probes for the detection of specific gene sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(6), 1735–9.
- Hanes, J. W., & Johnson, K. a. (2008). Real-time measurement of pyrophosphate release kinetics. *Analytical Biochemistry*, 372(1), 125–127.
- Hartlerode, A. J., & Scully, R. (2009). Mechanisms of double-strand break repair in somatic mammalian cells. *The Biochemical journal*, 423(2), 157–68.
- Hasan, S., El-Andaloussi, N., Hardeland, U., Hassa, P. O., Bürki, C., Imhof, R., Schär, P., et al. (2002). Acetylation regulates the DNA end-trimming activity of DNA polymerase beta. *Molecular cell*, 10(5), 1213–22.
- Hefferin, M. L., & Tomkinson, A. E. (2005). Mechanism of DNA double-strand break repair by non-homologous end joining. *DNA repair*, 4(6), 639–48.
- Hentges, P., Ahnesorg, P., Pitcher, R. S., Bruce, C. K., Kysela, B., Green, A. J., Bianchi, J., et al. (2006). Evolutionary and functional conservation of the DNA non-homologous end-joining protein, XLF/Cernunnos. *The Journal of biological chemistry*, 281(49), 37517–26.
- Hopkins, R. L., & Goodman, M. F. (1980). Deoxyribonucleotide pools, base pairing, and sequence configuration affecting bromodeoxyuridine- and 2-aminopurine-induced mutagenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77(4), 1801–5.
- Horton, J. K., Srivastaval, D. K., Zmudzka, B. Z., & Wilson, S. H. (1995). Strategic down-regulation of DNA polymerase β by antisense RNA sensitizes mammalian cells to specific DNA damaging agents. *Nucleic acids research*, 23(19), 3810–3815.
- Hubscher, U., Maga, G., & Spadari, S. (2002). Eukaryotic DNA polymerases. *Annual review of biochemistry*, 71, 133–63.
- Ichi, K. K., Moura, J., Houts, G. E., & Bollum, F. J. (1967). Deoxynucleotide-polymerizing Enzymes of Calf Thymus Gland. *The Journal of biological chemistry*, 242(11), 2784–2789.
- Idriss, H. T., Al-Assar, O., & Wilson, S. H. (2002). DNA polymerase β . *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 34(4), 321–324.
- Intano, G. W., McMahan, C. a, Walter, R. B., McCarrey, J. R., & Walter, C. a. (2001). Mixed spermatogenic germ cell nuclear extracts exhibit high base excision repair activity. *Nucleic acids research*, 29(6), 1366–72.

- Ito, J., & Braithwaite, D. K. (1991). Compilation and alignment of DNA polymerase sequences. *Nucleic acids research*, 19(15), 4045–57.
- Jang, Y. H., Goddard, W. a, Noyes, K. T., Sowers, L. C., Hwang, S., & Chung, D. S. (2002). First principles calculations of the tautomers and pK(a) values of 8-oxoguanine: implications for mutagenicity and repair. *Chemical research in toxicology*, 15(8), 1023–35.
- Johnson, A., & O'Donnell, M. (2005). Cellular DNA replicases: components and dynamics at the replication fork. *Annual review of biochemistry*, 74, 283–315.
- Joyce, C. M. (2004). T4 replication: what does “processivity” really mean? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(22), 8255–6.
- Juárez, R., Ruiz, J. F., Nick McElhinny, S. a, Ramsden, D., & Blanco, L. (2006). A specific loop in human DNA polymerase mu allows switching between creative and DNA-instructed synthesis. *Nucleic acids research*, 34(16), 4572–82.
- Karanjawala, Z. E., Murphy, N., Hinton, D. R., Hsieh, C., & Lieber, M. R. (2002). and Is Associated with the Neuronal Apoptosis Observed in DNA Double-Strand Break Repair Mutants. *Current Biology*, 12(02), 397–402.
- Kelman, Z. (1997). PCNA: structure, functions and interactions. *Oncogene*, 14(6), 629–40.
- Kim, E. E., & Wyckoff, H. W. (1991). Reaction mechanism of alkaline phosphatase based on crystal structures. Two-metal ion catalysis. *Journal of molecular biology*, 218(2), 449–64.
- Kirouac, K. N., & Ling, H. (2011). Unique active site promotes error-free replication opposite an 8-oxo-guanine lesion by human DNA polymerase iota. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(8), 3210–5.
- Kobayashi, M., Figaroa, F., Meeuwenoord, N., Jansen, L. E. T., & Siegal, G. (2006). Characterization of the DNA binding and structural properties of the BRCT region of human replication factor C p140 subunit. *The Journal of biological chemistry*, 281(7), 4308–17.
- Komori T, Okada A, Stewart V, A. F. (1993). Lack of N regions in antigen receptor variable region genes of TdT-deficient lymphocytes. *Science*.
- Kosa, J. L., & Sweasy, J. B. (1999). The E249K mutator mutant of DNA polymerase beta extends mispaired termini. *The Journal of biological chemistry*, 274(50), 35866–72.
- Kramer, K. M., Brock, J. a, Bloom, K., Moore, J. K., & Haber, J. E. (1994). Two different types of double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae* are repaired by similar RAD52-independent, nonhomologous recombination events. *Molecular and cellular biology*, 14(2), 1293–301.
- Krayevsky, a a, Victorova, L. S., Arzumanov, a a, & Jasko, M. V. (2000). Terminal deoxynucleotidyl transferase. catalysis of DNA (oligodeoxynucleotide) phosphorylation. *Pharmacology & therapeutics*, 85(3), 165–73.
- Kubota Y, Nash RA, Klungland A, Schär P, Barnes DE, L. T. (1996). Reconstitution of DNA base excision-repair with purified human proteins: interaction between DNA polymerase beta and the XRCC1 protein. *EMBO J*.

- Kunkel, T. A., & Bebenek, K. (2000). DNA REPLICATION FIDELITY, 497–529.
- Kunkel, T. a. (1985). The mutational specificity of DNA polymerases- α and γ during in vitro DNA synthesis. *The Journal of biological chemistry*, 260(23), 12866–74.
- Kunkel, T. a. (2009). Evolving views of DNA replication (in)fidelity. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, 74, 91–101.
- Kunkel, Thomas a. (2004). DNA replication fidelity. *The Journal of biological chemistry*, 279(17), 16895–8.
- LAWRENCE, C. W. (2004). Cellular functions of DNA polymerase zeta and Rev1 protein. *ADVANCES IN PROTEIN CHEMISTRY*,.
- Laat, W. L. D., Jaspers, N. G. J., & Hoeijmakers, J. H. J. (1999). Molecular mechanism of nucleotide excision repair Molecular mechanism of nucleotide excision repair. *Genes & Development*, 13, 768–785.
- Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., Devon, K., et al. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409(6822), 860–921.
- Lang, T., Maitra, M., Starcevic, D., Li, S.-X., & Sweasy, J. B. (2004). A DNA polymerase beta mutant from colon cancer cells induces mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(16), 6074–9.
- Lee, J. W., Blanco, L., Zhou, T., Garcia-Diaz, M., Bebenek, K., Kunkel, T. a, Wang, Z., et al. (2004). Implication of DNA polymerase lambda in alignment-based gap filling for nonhomologous DNA end joining in human nuclear extracts. *The Journal of biological chemistry*, 279(1), 805–11.
- Lehman, I. R., Bessman, M. J., Simms, E. S., & Kornberg, A. (1957). Enzymatic Synthesis of Deoxiribonucleic acid. *Journal of molecular biology*.
- Leung, C. C. Y., & Glover, J. N. M. (2011). BRCT domains: Easy as one, two, three. *Cell Cycle*, 10(15), 2461–2470.
- Li, Ying, & Waksman, G. (1998). Crystal structures of the Klenow fragment of *Thermus aquaticus* DNA polymerase I complexed with deoxyribonucleoside triphosphates. *Protein Science*, 1116–1123.
- Li, Yunlang, & Schlick, T. (2010). Modeling DNA polymerase μ motions: subtle transitions before chemistry. *Biophysical journal*, 99(10), 3463–72.
- Lieber, M. R. (2008). The mechanism of human nonhomologous DNA end joining. *The Journal of biological chemistry*, 283(1), 1–5.
- Lieber, M. R. (2010). The mechanism of double-strand DNA break repair by the Nonhomologous End joining pathway. *Annu Rev Biochem*, (79), 181–211.
- Lieber, M. R., Ma, Y., Pannicke, U., & Schwarz, K. (2003). Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 4(9), 712–20.

- Lieber, M. R., Ma, Y., Pannicke, U., & Schwarz, K. (2004). The mechanism of vertebrate nonhomologous DNA end joining and its role in V(D)J recombination. *DNA repair*, 3(8-9), 817–26.
- Lim, S. E., Longley, M. J., & Copeland, W. C. (1999). The mitochondrial p55 accessory subunit of human DNA polymerase gamma enhances DNA binding, promotes processive DNA synthesis, and confers N-ethylmaleimide resistance. *The Journal of biological chemistry*, 274(53), 38197–203.
- Lindahl T, Prigent C, Barnes DE, Lehmann AR, Satoh MS, Roberts E, Nash RA, Robins P, D. G. (1993). DNA joining in mammalian cells. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*.
- Livneh, Z., Ziv, O., & Shachar, S. (2010). Multiple two-polymerase mechanisms in mammalian translesion DNA synthesis. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 9(4), 729–35.
- Longley, D. B., Harkin, D. P., & Johnston, P. G. (2003). 5-Fluorouracil: Mechanisms of Action and Clinical Strategies. *Nature reviews. Cancer*, 3(5), 330–8.
- Longley, M. J., Graziewicz, M. A., Bienstock, R. J., & Copeland, W. C. (2005). Consequences of mutations in human DNA polymerase gamma. *Gene*, 354, 125–31.
- Ma, J., Kim, E. M., Haber, J. E., & Lee, S. E. (2003). Yeast Mre11 and Rad1 Proteins Define a Ku-Independent Mechanism To Repair Double-Strand Breaks Lacking Overlapping End Sequences. *Molecular and cellular biology*, 23(23), 8820–8828.
- Ma, Y., Lu, H., Tippin, B., Goodman, M. F., Shimazaki, N., Koiwai, O., Hsieh, C.-L., et al. (2004). A biochemically defined system for mammalian nonhomologous DNA end joining. *Molecular cell*, 16(5), 701–13.
- Maciejewski, M. W., Shin, R., Pan, B., Marintchev, A., Denninger, A., Mullen, M. A., Chen, K., et al. (2001). Solution structure of a viral DNA repair polymerase, 8(11).
- Maga, G., Crespan, E., Wimmer, U., Loon, B. V., Amoroso, A., Mondello, C., Belgiovine, C., et al. (2008). Replication protein A and proliferating cell nuclear antigen coordinate DNA polymerase selection in 8-oxo-guanine repair Results, (16), 4–9.
- Maga, G., Shevelev, I., Villani, G., Spadari, S., & Hübscher, U. (2006). Human replication protein A can suppress the intrinsic in vitro mutator phenotype of human DNA polymerase lambda. *Nucleic acids research*, 34(5), 1405–15.
- Maga, G., Villani, G., Crespan, E., Wimmer, U., Ferrari, E., Bertocci, B., & Hübscher, U. (2007). 8-oxo-guanine bypass by human DNA polymerases in the presence of auxiliary proteins. *Nature*, 447(7144), 606–8.
- Maga, G., Villani, G., Ramadan, K., Shevelev, I., Tanguy Le Gac, N., Blanco, L., Blanca, G., et al. (2002). Human DNA polymerase lambda functionally and physically interacts with proliferating cell nuclear antigen in normal and translesion DNA synthesis. *The Journal of biological chemistry*, 277(50), 48434–48440.
- Mahajan, K. N., McElhinny, S. A. N., Mitchell, B. S., Ramsden, D. A., Hill, C., & Carolina, N. (2002a). Association of DNA Polymerase μ (pol μ) with Ku and Ligase IV : Role for pol μ in End-Joining Double-Strand Break Repair. *Molecular and cellular biology*, 22(14), 5194–5202.

- Mahajan, K. N., Mcelhinny, S. A. N., Mitchell, B. S., Ramsden, D. A., Hill, C., & Carolina, N. (2002b). Association of DNA Polymerase μ (pol μ) with Ku and Ligase IV : Role for pol in End-Joining Double-Strand Break Repair. *Molecular and cellular biology*, 22(14), 5194–5202.
- Manke, I. a, Lowery, D. M., Nguyen, A., & Yaffe, M. B. (2003). BRCT repeats as phosphopeptide-binding modules involved in protein targeting. *Science (New York, N.Y.)*, 302(5645), 636–9.
- Martin, M. J., Garcia-Ortiz, M. V., Esteban, V., & Blanco, L. (2013). Ribonucleotides and manganese ions improve non-homologous end joining by human Pol μ . *Nucleic acids research*, 1–9.
- Martin, M. J., Garcia-Ortiz, M. V., Gomez-Bedoya, A., Esteban, V., Guerra, S., & Blanco, L. (2013). A specific N-terminal extension of the 8 kDa domain is required for DNA end-bridging by human Pol μ and Pol λ . *Nucleic acids research*, 1–12.
- Martin, M. J., Juarez, R., & Blanco, L. (2012a). DNA-binding determinants promoting NHEJ by human Pol μ . *Nucleic acids research*, 1–15
- Martin, M. J., Juarez, R., & Blanco, L. (2012b). DNA-binding determinants promoting NHEJ by human Pol μ (Sumpl. Mat). *Nucleic acids research*.
- Masuda, K., Ouchida, R., Takeuchi, A., Saito, T., Koseki, H., Kawamura, K., Tagawa, M., et al. (2005). DNA polymerase theta contributes to the generation of C/G mutations during somatic hypermutation of Ig genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(39), 13986–91.
- Matsumoto, Y., Kim, K., Katz, D. S., & Feng, J. a. (1998). Catalytic center of DNA polymerase beta for excision of deoxyribose phosphate groups. *Biochemistry*, 37(18), 6456–64.
- Matsuoka, S., Ballif, B. a, Smogorzewska, A., McDonald, E. R., Hurov, K. E., Luo, J., Bakalarski, C. E., et al. (2007). ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science (New York, N.Y.)*, 316(5828), 1160–6.
- Menezes, M. R., & Sweasy, J. B. (2012). Mouse Models of DNA Polymerases. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 000(May).
- Mercedes E. Arana‡, Kei-ichi Takata§, Miguel Garcia-Diaz‡, Richard D. Wood§, and T. A. K. (2007). A unique error signature for human DNA polymerase ν . *DNA Repair*, 6(2), 213–223.
- Mills, K. D., Ferguson, D. O., & Alt, F. W. (2003). The role of DNA breaks in genomic instability and tumorigenesis. *Immunological reviews*, 194, 77–95.
- Mladenov, E., & Iliakis, G. (2011). Induction and repair of DNA double strand breaks: the increasing spectrum of non-homologous end joining pathways. *Mutation research*, 711(1-2), 61–72.
- Moon, A. F., Garcia-Diaz, M., Batra, V. K., Beard, W. a, Bebenek, K., Kunkel, T. a, Wilson, S. H., et al. (2007). The X family portrait: structural insights into biological functions of X family polymerases. *DNA repair*, 6(12), 1709–25. doi:10.1016/j.dnarep.2007.05.009
- Moon, A. F., Garcia-Diaz, M., Bebenek, K., Davis, B. J., Zhong, X., Ramsden, D. a, Kunkel, T. a, et al. (2007). Structural insight into the substrate specificity of DNA Polymerase μ . *Nature structural & molecular biology*, 14(1), 45–53.

- Morgan WF, Day JP, Kaplan MI, McGhee EM, L. C. (1996). Genomic instability induced by ionizing radiation. *Radiat Res.*
- Moriya, M. (1993). Single-stranded shuttle phagemid for mutagenesis studies in mammalian cells: 8-oxoguanine in DNA induces targeted G.C-->T.A transversions in simian kidney cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(3), 1122–6.
- Mueller, G. A., Moon, A. F., Derose, E. F., Havener, J. M., Dale, A., Pedersen, L. C., & London, R. E. (2008). A comparison of BRCT domains involved in nonhomologous end-joining: Introducing the solution structure of the BRCT domain of polymerase lambda. *DNA repair*, 7(8), 1340–1351.
- Nagasawa, K., Kitamura, K., Yasui, a, Nimura, Y., Ikeda, K., Hirai, M., Matsukage, a, et al. (2000). Identification and characterization of human DNA polymerase beta 2, a DNA polymerase beta - related enzyme. *The Journal of biological chemistry*, 275(40), 31233–8.
- Nakamura, T., Zhao, Y., Yamagata, Y., Hua, Y., & Yang, W. (2012). Watching DNA polymerase η make a phosphodiester bond. *Nature*, 487(7406), 196–201.
- Nelson JR, Lawrence CW, H. D. (1996). Thymine-thymine dimer bypass by yeast DNA polymerase zeta. *Science*.
- Nick McElhinny, S., Ramsden, D. A., Hill, C., & Carolina, N. (2003). Polymerase Mu Is a DNA-Directed DNA / RNA Polymerase. *Molecular and cellular biology*, 23(7), 2309–2315.
- Nick McElhinny, S. a, Havener, J. M., Garcia-Diaz, M., Juárez, R., Bebenek, K., Kee, B. L., Blanco, L., et al. (2005). A gradient of template dependence defines distinct biological roles for family X polymerases in nonhomologous end joining. *Molecular cell*, 19(3), 357–66.
- Nick McElhinny, S. a, & Ramsden, D. a. (2004). Sibling rivalry: competition between Pol X family members in V(D)J recombination and general double strand break repair. *Immunological reviews*, 200(D), 156–64.
- Nita, M. E., Nagawa, H., Tominaga, O., Tsuno, N., Fujii, S., Sasaki, S., Fu, C. G., et al. (1998). 5-Fluorouracil induces apoptosis in human colon cancer cell lines with modulation of Bcl-2 family proteins. *British journal of cancer*, 78(8), 986–92.
- Nowak, R., Woszczyński, M., & Siedlecki, J. a. (1990). Changes in the DNA polymerase beta gene expression during development of lung, brain, and testis suggest an involvement of the enzyme in DNA recombination. *Experimental cell research*, 191(1), 51–6.
- Ohtsu, A., Boku, N., Yoshioka, T., Hyodo, I., Shirao, K., Shimada, Y., Saitoh, S., et al. (2003). A Phase II study of irinotecan in combination with 120-h infusion of 5-fluorouracil in patients with metastatic colorectal carcinoma: Japan Clinical Oncology Group Study (JCOG9703). *Japanese journal of clinical oncology*, 33(1), 28–32.
- Oliveros, M., Yáñez, R. J., Salas, M. L., Salas, J., Viñuela, E., & Blanco, L. (1997). Characterization of an African swine fever virus 20-kDa DNA polymerase involved in DNA repair. *The Journal of biological chemistry*, 272(49), 30899–910.
- Ollis, D. L., Brick, P., Hamlin, R., Xuong, N. G., & Steitz, T. A. (1985). Structure of large fragment of Escherichia coli DNA polymerase I complexed with dTMP. *Nature*, 313(6005), 762–6.

- Olsen, a K., Bjørtuft, H., Wiger, R., Holme, J., Seeberg, E., Bjørås, M., & Brunborg, G. (2001). Highly efficient base excision repair (BER) in human and rat male germ cells. *Nucleic acids research*, 29(8), 1781–90.
- Osheroff, W. P., Beard, W. a, Wilson, S. H., & Kunkel, T. a. (1999). Base substitution specificity of DNA polymerase beta depends on interactions in the DNA minor groove. *The Journal of biological chemistry*, 274(30), 20749–52.
- Pagès, V., & Fuchs, R. P. P. (2002). How DNA lesions are turned into mutations within cells? *Oncogene*, 21(58), 8957–66.
- Patel SS, Wong I, J. K. (1991). Pre-steady-state kinetic analysis of processive DNA replication including complete characterization of an exonuclease-deficient mutant. *Biochemistry*.
- Pelletier, H, Sawaya, M. R., Kumar, A., Wilson, S. H., & Kraut, J. (1994). Structures of ternary complexes of rat DNA polymerase beta, a DNA template-primer, and ddCTP. *Science (New York, N.Y.)*, 264(5167), 1891–903.
- Pelletier, H, Sawaya, M. R., Wolfle, W., Wilson, S. H., & Kraut, J. (1996). Crystal structures of human DNA polymerase beta complexed with DNA: implications for catalytic mechanism, processivity, and fidelity. *Biochemistry*, 35(39), 12742–61.
- Pelletier, Huguet, Sawaya, M. R., Wolfle, W., Wilson, S. H., & Kraut, J. (1996). A Structural Basis for Metal Ion Mutagenicity and Nucleotide Selectivity in Human DNA Polymerase β , 2960(95), 12762–12777.
- Picher, A. J., & Blanco, L. (2007). Human DNA polymerase lambda is a proficient extender of primer ends paired to 7,8-dihydro-8-oxoguanine. *DNA repair*, 6(12), 1749–56.
- Picher, A. J., García-Díaz, M., Bebenek, K., Pedersen, L. C., Kunkel, T. a, & Blanco, L. (2006). Promiscuous mismatch extension by human DNA polymerase lambda. *Nucleic acids research*, 34(11), 3259–66.
- Plug, a W., Clairmont, C. a, Sapi, E., Ashley, T., & Sweasy, J. B. (1997). Evidence for a role for DNA polymerase beta in mammalian meiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(4), 1327–31.
- Prakash, S., Johnson, R. E., & Prakash, L. (2005). Eukaryotic translesion synthesis DNA polymerases: specificity of structure and function. *Annual review of biochemistry*, 74, 317–53.
- Prasad, R., Beard, W. A., Chyan, J. Y., Maciejewski, M. W., Mullen, G. P., & Wilson, S. H. (1998). Functional Analysis of the Amino-terminal 8-kDa Domain of DNA Polymerase β as Revealed by Site-directed Mutagenesis. *The Journal of biological chemistry*, 273(18), 11121–11126.
- Prasad, R., Beard, W. A., Strauss, P. R., & Wilson, S. H. (1998). Human DNA Polymerase β Deoxyribose Phosphate Lyase. *The Journal of biological chemistry*, 273(24), 15263–15270.
- Prasad, R., Beard, W. A., & Wilson, S. H. (1994). Studies of Gapped DNA Substrate Binding by Mammalian DNA Polymerase β . *The Journal of biological chemistry*, 269(27), 18096–18101.

- Prasad, R., Longley, M. J., Sharief, F. S., Hou, E. W., Copeland, W. C., & Wilson, S. H. (2009). Human DNA polymerase theta possesses 5'-dRP lyase activity and functions in single-nucleotide base excision repair in vitro. *Nucleic acids research*, 37(6), 1868–77.
- Ramsden, D. a. (2011). Polymerases in nonhomologous end joining: building a bridge over broken chromosomes. *Antioxidants & redox signaling*, 14(12), 2509–19.
- Roth, D. B., & Wilson, J. H. (1986). Nonhomologous recombination in mammalian cells: role for short sequence homologies in the joining reaction. *Molecular and cellular biology*, 6(12), 4295–304.
- Roychoudhury, R. (1972). Enzymic Synthesis of Polynucleotides. *The Journal of biological chemistry*, 247(12).
- Ruiz, J F, Domínguez, O., Laín de Lera, T., García-Díaz, M., Bernad, a, & Blanco, L. (2001). DNA polymerase mu, a candidate hypermutase? *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 356(1405), 99–109.
- Ruiz, J. F. (2003). Lack of sugar discrimination by human Pol mu requires a single glycine residue. *Nucleic Acids Research*, 31(15), 4441–4449.
- Ruiz, José F, Lucas, D., García-Palomero, E., Saez, A. I., González, M. a, Piris, M. a, Bernad, A., et al. (2004). Overexpression of human DNA polymerase mu (Pol mu) in a Burkitt's lymphoma cell line affects the somatic hypermutation rate. *Nucleic acids research*, 32(19), 5861–73.
- Salas, M. (1991). PROTEIN-PRIMING OF DNA REPLICATION. *Annu Rev. Biochem.*, 60: 39–71.
- Sale, J. E., Lehmann, A. R., & Woodgate, R. (2012). Y-family DNA polymerases and their role in tolerance of cellular DNA damage. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 13(3), 141–52.
- Santi, D. V., & Mchenry, C. S. (1972). 5-Fluoro-2'-Deoxyuridylate:, 69(7), 1855–1857.
- Sawaya, M. R., Pelletier, H., Kumar, a, Wilson, S. H., & Kraut, J. (1994). Crystal structure of rat DNA polymerase beta: evidence for a common polymerase mechanism. *Science (New York, N.Y.)*, 264(5167), 1930–5.
- Sawaya, M. R., Prasad, R., Wilson, S. H., Kraut, J., & Pelletier, H. (1997). Crystal structures of human DNA polymerase beta complexed with gapped and nicked DNA: evidence for an induced fit mechanism. *Biochemistry*, 36(37), 11205–15.
- Schofield, M. J., & Hsieh, P. (2003). DNA mismatch repair: molecular mechanisms and biological function. *Annual review of microbiology*, 57, 579–608.
- Semizarov, D. G., Arzumanov, a a, Dyatkina, N. B., Meyer, a, Vichier-Guerre, S., Gosselin, G., Rayner, B., et al. (1997). Stereoisomers of deoxynucleoside 5'-triphosphates as substrates for template-dependent and -independent DNA polymerases. *The Journal of biological chemistry*, 272(14), 9556–60.
- Shcherbakova, P. V., Bebenek, K., & Kunkel, T. a. (2003). Functions of eukaryotic DNA polymerases. *Science of aging knowledge environment : SAGE KE*, 2003(8), RE3.

- Shimazaki, N., Yoshida, K., Kobayashi, T., Toji, S., Tamai, K., & Koiwai, O. (2002). Over-expression of human DNA polymerase lambda in E. coli and characterization of the recombinant enzyme. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*, 7(7), 639–51.
- Showalter, A. K. (2001). Solution structure of a viral DNA polymerase X and evidence for a mutagenic function, *Nature Structural Biology* 8(11).
- Shrivastav, M., De Haro, L. P., & Nickoloff, J. a. (2008). Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell research*, 18(1), 134–47.
- Singhal, R. K., & Wilson, S. H. (1993). Short gap-filling synthesis by DNA polymerase beta is processive. *The Journal of biological chemistry*, 268(21), 15906–11.
- Sliwinski, T., Ziemba, P., Morawiec, Z., Kowalski, M., Zadrozny, M., & Blasiak, J. (2007). Polymorphisms of the DNA polymerase beta gene in breast cancer. *Breast cancer research and treatment*, 103(2), 161–6.
- Sobol RW, Horton JK, Kühn R, Gu H, Singhal RK, Prasad R, Rajewsky K, W. S. (1996). Requirement of mammalian DNA polymerase-beta in base-excision repair. *Nature*.
- Srivastava, D. K., Husain, I., Arteaga, C. L., & Wilson, S. H. (1999). DNA polymerase beta expression differences in selected human tumors and cell lines. *Carcinogenesis*, 20(6), 1049–54.
- Steitz, T. A., Smerdon, S. J., Jäger, J., & Joyce, C. M. (1994). A unified polymerase mechanism for nonhomologous DNA and RNA polymerases. *Science (New York, N.Y.)*, 266(5193), 2022–5.
- Steitz, T. a. (1999a). DNA polymerases: structural diversity and common mechanisms. *The Journal of biological chemistry*, 274(25), 17395–8.
- Steitz, T. a. (1999b). DNA polymerases: structural diversity and common mechanisms. *The Journal of biological chemistry*, 274(25), 17395–8.
- Stracevic, D. Dalal, S. and Sweasy, J. B. (2004). Is there a link between DNA polymerase β and cancer? *Cell Cycle*, 3(August), 998–1001.
- Streisinger G, Okada Y, Emrich J, Newton J, Tsugita A, Terzaghi E, I. M. (1966). Frameshift mutations and the genetic code. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*.
- Sugo, N., Aratani, Y., Nagashima, Y., Kubota, Y., & Koyama, H. (2000). Neonatal lethality with abnormal neurogenesis in mice deficient in DNA polymerase beta. *The EMBO journal*, 19(6), 1397–404.
- Sweasy, J. B., Lang, T., Starcevic, D., Sun, K.-W., Lai, C.-C., Dimaio, D., & Dalal, S. (2005). Expression of DNA polymerase {beta} cancer-associated variants in mouse cells results in cellular transformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(40), 14350–5.
- Sweasy, J. B., Lauper, J. M., & Eckert, K. A. (2006). DNA Polymerases and Human Diseases. *Radiation Research*, 166, 693–714.
- Sweasy, J. B., & Loeb, L. A. (1992). Communication Can Substitute for DNA Polymerase I during DNA Replication in E.coli. *The Journal of biological chemistry*, 267(20), 1407–1410.

- Takata, M., Sasaki, M. S., Sonoda, E., Morrison, C., Hashimoto, M., Utsumi, H., Yamaguchi-Iwai, Y., et al. (1998). Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *The EMBO journal*, 17(18), 5497–508.
- Taladriz, S., Hanke, T., Ramiro, M. J., García-Díaz, M., García De Lacoba, M., Blanco, L., & Larraga, V. (2001). Nuclear DNA polymerase beta from *Leishmania infantum*. Cloning, molecular analysis and developmental regulation. *Nucleic acids research*, 29(18), 3822–34.
- Tanaka, M., Yoshida, S., & Saneyoshi, M. (1981). Utilization of 5-Fluoro-2' -deoxyuridine Triphosphate and 5-Fluoro-2' -deoxycytidine Triphosphate in DNA Synthesis by DNA Polymerases α and β from Calf Thymus. *Cancer research*, 4132–4135.
- Teo, S. H., & Jackson, S. P. (1997). Identification of *Saccharomyces cerevisiae* DNA ligase IV: involvement in DNA double-strand break repair. *The EMBO journal*, 16(15), 4788–95.
- Terrados, G., Capp, J.-P., Canitrot, Y., García-Díaz, M., Bebenek, K., Kirchhoff, T., Villanueva, A., et al. (2009). Characterization of a natural mutator variant of human DNA polymerase lambda which promotes chromosomal instability by compromising NHEJ. *PloS one*, 4(10), e7290.
- Thompson, T. E., Rogan, P. K., Risinger, J. I., & Taylor, J. A. (2002). Splice Variants but not Mutations of DNA Polymerase β Are Common in Bladder Cancer. *Cancer research*, 62, 3251–3256.
- Uchiyama, Y., Takeuchi, R., Kodera, H., & Sakaguchi, K. (2009). Distribution and roles of X-family DNA polymerases in eukaryotes. *Biochimie*, 91(2), 165–70.
- Ulrich, H. D. (2004). How to Activate a Damage-Tolerant Polymerase. *Cell Cycle*, (January), 15–18.
- van Loon, B., & Hübscher, U. (2009). An 8-oxo-guanine repair pathway coordinated by MUTYH glycosylase and DNA polymerase lambda. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(43), 18201–6.
- Vande Berg, B. J., Beard, W. a, & Wilson, S. H. (2001). DNA structure and aspartate 276 influence nucleotide binding to human DNA polymerase beta. Implication for the identity of the rate-limiting conformational change. *The Journal of biological chemistry*, 276(5), 3408–16.
- WATSON JD, C. F. (1953). The structure of DNA. Retrieved December 28, 2012,
- Walker, J. R., Corpina, R. a, & Goldberg, J. (2001). Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. *Nature*, 412(6847), 607–14.
- Wang, L., Patel, U., Ghosh, L., & Banerjee, S. (1992). DNA Polymerase β Mutations in Human Colorectal Cancer DNA Polymerase β Mutations in Human Colorectal Cancer. *Cancer research*, 4824–4827.
- Wang TS, Eichler DC, K. D. (1977). Effect of Mn^{2+} on the in vitro activity of human deoxyribonucleic acid polymerase beta. *Biochemistry*.
- Werneburg, B. G., Ahn, J., Zhong, X., Hondal, R. J., Kraynov, V. S., & Tsai, M. D. (1996). DNA polymerase beta: pre-steady-state kinetic analysis and roles of arginine-283 in catalysis and fidelity. *Biochemistry*, 35(22), 7041–50.

- West, S. C. (2003). Molecular views of recombination proteins and their control. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 4(6), 435–45.
- Wilson, T. E., Grawunder, U., & Lieber, M. R. (1997). Yeast DNA ligase IV mediates non-homologous DNA end joining functional as well as structural homology with human DNA ligase. *Nature*, 388(July), 495–498.
- Wilson, T. E., & Lieber, M. R. (1999). Efficient Processing of DNA Ends during Yeast Nonhomologous End Joining. *The Journal of biological chemistry*, 274(33), 23599–23609.
- Woods, N. T., Mesquita, R. D., Sweet, M., Carvalho, M. a, Li, X., Liu, Y., Nguyen, H., et al. (2012). Charting the landscape of tandem BRCT domain-mediated protein interactions. *Science signaling*, 5(242), rs6.
- Wyatt, M. D., & Wilson, D. M. (2009). Participation of DNA repair in the response to 5-fluorouracil. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 66(5), 788–99.
- YANBIN ZHANG, XIAOHUA WU, FENGHUA YUAN, ZHONGWEN XIE, A. Z. W. (2001). Highly Frequent Frameshift DNA Synthesis by Human DNA Polymerase μ . *Molecular and cellular biology*, 21(23), 7995–8006.
- Yamanaka, K., Minko, I. G., Takata, K., Kolbanovskiy, A., Kozekov, I. D., Wood, R. D., Rizzo, C. J., et al. (2010). Novel enzymatic function of DNA polymerase ν in translesion DNA synthesis past major groove DNA-peptide and DNA-DNA cross-links. *Chemical research in toxicology*, 23(3), 689–95.
- Yamtich, J., & Sweasy, J. B. (2010). DNA polymerase Family X: Function, structure and cellular roles. *Biochimica et biophysica acta*, 1804(5), 1136–50.
- Yan, C. T., Boboila, C., Souza, E. K., Franco, S., Hickernell, T. R., Murphy, M., Gumaste, S., et al. (2007). IgH class switching and translocations use a robust non-classical end-joining pathway. *Nature*, 449(7161), 478–82.
- Yaneva, M., Kowalewski, T., & Lieber, M. R. (1997). Interaction of DNA-dependent protein kinase with DNA and with Ku: biochemical and atomic-force microscopy studies. *The EMBO journal*, 16(16), 5098–112.
- Yousefzadeh, M. J., & Wood, R. D. (2012). DNA polymerase POLQ and cellular defense against DNA damage. *DNA repair*, 12(1), 1–9.
- Zhang, X., Moréra, S., Bates, P. a, Whitehead, P. C., Coffey, a I., Hainbucher, K., Nash, R. a, et al. (1998). Structure of an XRCC1 BRCT domain: a new protein-protein interaction module. *The EMBO journal*, 17(21), 6404–11.
- Zietlow, L., Smith, L. A., Bessho, M., & Bessho, T. (2010). Evidence for the involvement of human DNA polymerase η in the repair of DNA interstrand cross-links. *Biochemistry*, 48(49), 11817–11824.

ANEXO

1

Abreviaturas

5FU	5-fluorouracilo
5FdUMP	5-fluorodeoxiuridinamonofosfato
5FdUTP	5-fluorodeoxiuridinatrifosfato
5FUMP	5-fluorouridinamonofosfato
5FUTP	5-fluorouridinatrifosfato
8oxoG	7,8-dihidro-8-oxoguanina
AP	apurínico/apirimidínico
APE	endonucleasa apurínica
ATP	adenosina-5'-trifosfato
BER	reparación por escisión de base
BSA	albúmina de suero bovino
BRCT	Dominio BRCA1 C-terminal
C-terminal	carboxilo terminal
CV	volúmenes de columna
dA	deoxiadenosina
dAMP	deoxiadenosina-5'-monofosfato
dATP	deoxiadenosina-5'-trifosfato
dC	deoxicitidina
dCTP	deoxicitidina-5'-trifosfato
DDR	Respuesta a daño en el DNA
dG	deoxiguanosina
dGTP	deoxiguanosina-5'-trifosfato
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTP	deoxinucleótido-5'-trifosfato
ddNTP	dideoxinucleótido-5'-trifosfato
dRP	deoxiribosa fosfato
DSB	roturas de doble cadena
dT	deoxitimidina
DTT	ditiotreitól
dTTP	deoxitimidina-5'-trifosfato
dTMP	deoxitimidina-5'-monofosfato
dU	deoxiuridina
dUMP	deoxiuridina-5'-monofosfato
dUTP	deoxiuridina-5'-trifosfato
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	etilén diamino tetraacetato

HhH	hélice-giro-hélice
HR	recombinación homóloga
IPTG	isopropil- β -D-tiogalactósido
kDa	kilodalton
LiPol β	DNA Polimerasa β de <i>L. infantum</i>
min	minutos
MMEJ	reunión de extremos mediada por micro-homología
MMR	reparación de desapareamientos
NER	reparación por escisión de nucleótido
NHEJ	reunión de extremos no homólogos
NLS	secuencia de localización nuclear
N-terminal	amino terminal
O/N	durante la noche (<i>over night</i>)
-P	fosfato
PAGE	electroforesis en gel de acrilamida
pb	pares de bases
PCNA	antígeno de proliferación nuclear
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PEI	polietilenimina
PHP	dominio fosfodiesterasa
PM	peso molecular
PNK	polinucleótido quinasa
Pol	polimerasa
Pol β	DNA polimerasa β
Pol λ	DNA polimerasa lambda
Pol μ	DNA polimerasa mu
PoliQ	poliglutaminas
PPi	pirofosfato
RI	radiación ionizante
RNA	ácido ribonucleico
RNA _m	ácido ribonucleico mensajero
rNTP	ribonucleótido-5'-trifosfato
rpm	revoluciones por minuto
ROS	especie reactiva de oxígeno
RPA	Proteína A de Replicación
rpm	revoluciones por minuto

SDS	Dodecil Sulfato Sódico
SHM	hipermutación somática
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S. pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
TdT	deoxinucleotidil transferasa terminal
TLS	síntesis a través de lesiones
TP	timidín fosforilasa
tRNA	ácido ribonucleico de transferencia
TS	timidilato sintasa
U	uracilo
u	unidades
UDG	uracil DNA glicosilasa
UV	ultravioleta
V(D)J	recombinación específica de genes receptores de antígeno.
VPPA	Virus de la Peste Porcina Africana

Códigos de una y tres letras de los aminoácidos

Alanina	Ala, A	Leucina	Leu, L
Arginina	Arg, R	Lisina	Lys, K
Ácido aspártico	Asp, D	Metionina	Met, M
Asparagina	Asn, N	Fenilalanina	Phe, F
Cisteína	Cys, C	Prolina	Pro, P
Ácido glutámico	Glu, E	Serina	Ser, S
Glicina	Gly, G	Tirosina	Tyr, Y
Glutamina	Gln, Q	Treonina	Thr, T
Histidina	His, H	Triptófano	Trp, W
Isoleucina	Ile, I	Valina	Val, V

2

Glosario

En esta memoria se ha tratado de evitar el uso de anglicismos. Sin embargo, en algunos casos se ha preferido mantener el término original, bien por no existir una correspondencia adecuada en castellano o bien por estar su uso muy generalizado en el lenguaje científico.

Antisense:

Downstream: aplicado a un oligonucleótido es la cadena de DNA que hibrida con la cadena molde y que contiene el extremo 5' de un *gap*.

Cartoon: representación de la estructura tridimensional de las proteínas donde las láminas β y las hélices α se muestran acorde con la información disponible en la base de datos “*Protein Data Bank*” (PDB)

Core: Núcleo catalítico de las enzimas.

Flap: extremo de cadena sencilla de DNA que se genera por desplazamiento del extremo 5' de un *gap* o por alineamiento incompleto de cadenas parcialmente complementarias.

Gap: hueco de longitud variable en el DNA, que supone una región de cadena sencilla embebida en un DNA de doble cadena.

Loop: estructura secundaria de las proteínas en la que los aminoácidos adquieren la forma de un bucle o lazo.

Scrunching: del inglés apretujar, estrujar. Hace referencia al estrujamiento de las bases del DNA molde cuando los *gaps* son mayores de un nucleótido mediado por las DNA polimerasas durante los procesos de replicación y reparación del DNA.

Slippage: del inglés resbalón. Hace referencia al deslizamiento y recolocación de las bases en el DNA mediado por las DNA polimerasas cuando existen secuencias repetidas.

SNP: de las siglas “*Single Nucleotide Polymorphism*” en inglés, con traducción al español: polimorfismo de un solo nucleótido. Se considera polimorfismo a una variación en la secuencia de DNA de un gen que afecta a una sola base y que genera una variante de la proteína representada en al menos un 1% de la población.

Splicing: Procesamiento del RNA mensajero que produce la omisión de uno o varios exones.

Sticks: Aplicado a la representación de la estructura tridimensional de las proteínas para visualizar las cadenas laterales de los aminoácidos.

Upstream: aplicado a un oligonucleótido es la cadena de ADN que hibrida con la cadena molde y que contiene el extremo 3' de un *gap*.

Wild-type (wt): tipo silvestre, sin modificación genética.

3

*Artículo relacionado con esta
Tesis Doctoral*

A specific N-terminal extension of the 8 kDa domain is required for DNA end-bridging by human Pol μ and Pol λ

Maria Jose Martin*, Maria Victoria Garcia-Ortiz, Ana Gomez-Bedoya, Veronica Esteban, Susana Guerra and Luis Blanco*

Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC-UAM), 28049 Madrid, Spain

Received February 27, 2013; Revised July 12, 2013; Accepted July 14, 2013

ABSTRACT

Human DNA polymerases mu (Pol μ) and lambda (Pol λ) are X family members involved in the repair of double-strand breaks in DNA during non-homologous end joining. Crucial abilities of these enzymes include bridging of the two 3' single-stranded overhangs and trans-polymerization using one 3' end as primer and the other as template, to minimize sequence loss. In this context, we have studied the importance of a previously uncharacterised sequence ('brooch'), located at the N-terminal boundary of the Pol β -like polymerase core, and formed by Tyr¹⁴¹, Ala¹⁴², Cys¹⁴³, Gln¹⁴⁴ and Arg¹⁴⁵ in Pol μ , and by Trp²³⁹, Val²⁴⁰, Cys²⁴¹, Ala²⁴² and Gln²⁴³ in Pol λ . The brooch is potentially implicated in the maintenance of a closed conformation throughout the catalytic cycle, and our studies indicate that it could be a target of Cdk phosphorylation in Pol μ . The brooch is irrelevant for 1 nt gap filling, but of specific importance during end joining: single mutations in the conserved residues reduced the formation of two ended synapses and strongly diminished the ability of Pol μ and polymerase lambda to perform non-homologous end joining reactions *in vitro*.

INTRODUCTION

Most nucleic acid-synthesizing enzymes exhibit large structural changes on binding to the DNA substrate: some of the substrate binding energy is used to organize the active site and orient this substrate for catalysis. Similarly, the binding of a nucleotide to a high-fidelity DNA polymerase/DNA complex induces a subtle change in the structure of the enzyme from an 'open' to a 'closed'

state [see [Supplementary Figure S1A](#) for an example with Pol β ; reviewed in (1)]. One role of this conformational change is to allow the rapid binding of substrates (and release of products) in the open state, while inducing optimal alignment of catalytic residues surrounding the substrates in the closed state. The shape of the base pair formed determines the fate of the weakly bound nucleotide during the conformational change step: only a correct base pair induces closing of the enzyme to form a tight catalytic complex; conversely, if a mismatched nucleotide is bound, the enzyme does not close, but rather proceeds to release the nucleotide while reducing the rate of catalysis.

Structural characterization of several DNA polymerases from families A, B and X suggests that deoxynucleotide (dNTP) binding induces large conformational changes affecting the relative positioning of both fingers and thumb subdomains (2–4). In the case of the human X family of polymerases, Pol β has been the paradigm for structural examination of mechanistic details. The structure of free Pol β showed that the polymerization domain (31 kDa), composed of subdomains fingers, palm and thumb, adopts a structure in space similar to a partially left hand, like other DNA polymerases evolutionarily unrelated (5,6); conversely its N-terminal domain (8 kDa) is shown to be located away from the polymerization domain in this structure ([Supplementary Figure S1A](#), Pol β – Apo). Crystallization of Pol β complexed with different DNA molecules demonstrated the structural basis for its preference for small DNA gaps. Pol β complexed with a template-primer substrate shows an arrangement in which the 8 kDa domain is not interacting with the DNA, being positioned at a distance from the polymerization domain, similar to the apoenzyme structure (7,8). In contrast, the crystal structure of Pol β complexed with a 1 nt gapped substrate shows that the 8 kDa domain binds to the 5'-phosphate of the gap while also interacting with the DNA substrate through the thumb subdomain

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +34 91 1964685; Fax: +34 91 1964420; Email: lblanco@cbm.uam.es
Correspondence may also be addressed to Maria Jose Martin. Tel: +44 01707 625772; Fax: +44 0207 269 3801; Email: maria.martin@cancer.org.uk
Present address:
Maria Jose Martin, London Research Institute, Cancer Research UK, Clare Hall Laboratories, South Mimms EN6 3LD, UK.

[(2,8); see [Supplementary Figure S1A](#), Pol β – Binary], thus promoting a more stable binding of the polymerase to this substrate. The resolution of the structure of Pol β with a 1 nt gap and incoming nucleotide allowed further study of the polymerization mechanism and conformational changes that occur during catalysis. It was determined that the incoming nucleotide causes the transition from an open to a closed complex by induction of a conformational change of the thumb subdomain (2), which has a decisive influence on the fidelity of the reaction [(9,10), see [Supplementary Figure S1A](#), Pol β – Ternary].

Unexpectedly, structural characterization of polymerase lambda (Pol λ) indicated that its catalytic cycle does not involve major subdomain motions [see comparison of a binary complex with gapped DNA (PDB ID: 1XSL) versus a pre-catalytic ternary complex with gapped DNA and incoming nucleotide (PDB ID: 1XSN), at [Supplementary Figure S1B](#)]. Thus, unlike Pol β , Pol λ is in a closed conformation before dNTP binding, and a shift of the DNA template is observed when comparing both crystal complexes (11) and predicted by molecular dynamic simulations (12). Informative crystal structures leading to this conclusion do not exist for polymerase mu (Pol μ): the only one solved is a ternary complex with gapped DNA and incoming nucleotide [(13); PDB ID: 2IHM; [Supplementary Figure S1C](#)]. However, like for Pol λ , an *ab initio* closed conformation of the Pol μ apoenzyme is predicted by molecular dynamics simulations (14).

In this work, we describe the functional importance of a newly recognized sequence located in the N-terminal boundary of the polymerase β -like core, formed by five residues highly conserved in Pol μ s (YACQR), Terminal deoxynucleotidyl transferases (TdT) (YACQR) and Pol λ s (WVCAQ) of different species, but absent in Pol β . This sequence, which we called ‘brooch’, seems to be involved in the maintenance of a closed conformation throughout the catalytic cycle, mediating interactions between the 8 kDa domain and the thumb subdomain. Our site-directed mutagenesis studies indicate that the lack of the conserved residues of the brooch affects specific functions of human Pol μ and Pol λ , such as end-bridging and trans-polymerization, or the filling-in of long gaps in DNA. These activities are of special importance during DNA repair processes such as non-homologous end joining (NHEJ), a pathway completely indispensable for the maintenance of genomic stability and cell viability.

MATERIALS AND METHODS

DNA and proteins

Synthetic DNA oligonucleotides were obtained from Isogen (Ijsselstein, Holland). PAGE-purified oligonucleotides were labelled at their 5' ends with [γ - 32 P]ATP. The oligonucleotides used to generate the DNA substrates were the following: for 1 nt gapped substrates, Sp1C (5'GATCACAGTGAGTAC), T13C (5'AGAAGTGTATCTCGTACTCACTGTGATC) and DG1-P (5'AGATACACTTCT); for 5 nt gapped substrates, Sp1C, T18 (5'ACTGGCCGTCGTTCTATTGTACTCACTGTGATC) and DG5 (5'AACGACGGCCAGT). For NHEJ assays, four

sets of oligonucleotides were used. A first set of primers sharing a common part (5'CCCTCCCTCCC...) and bearing different 3' protrusions (1AC [...CA3'], 1TG [...GT3'], 1A [...A3'], 1C [...C3'], 1G [...G3'], 1T [...T3']), were hybridized to 1D-NHEJ (5'GGGAGGGA GGG). A second set of primers sharing the common part (5'GCACTCACGTCCC...), and bearing different 3' overhangs (2AC [...CA3'], 2TG [...GT3'], 2A [...A3'], 2C [...C3'], 2G [...G3'], 2T [...T3']), were hybridized to oligonucleotide 2D-NHEJ (5'-GGGACGTGAGTGC). A third set of primers sharing the common part (5'CCCTCCCTCCG...), and bearing different 3' overhangs (D3 [...CGGC], D3+C [...GCGGCC]), were hybridized to D1 (5'CGGAGGGAGGG). A fourth set of primers sharing the common part (5' CCCTCCCTCCG...), and bearing different 3' overhangs (D4 [...CGCC], D4GC [...GCGCC]), were hybridized to D2 (5'GGGACGTGAGTGC). Oligonucleotides DG1-P, DG5, 2D-NHEJ and D2-P contain a 5'-P group when indicated. Ultrapure dNTPs, dideoxynucleotides (ddNTPs) and [γ - 32 P]ATP (3000 Ci/mmol) were purchased from GE Healthcare (USA). T4 polynucleotide kinase was obtained from New England Biolabs (Beverly, MA, USA). Pfu DNA polymerase was purchased from Promega Corporation (Madison, WI, USA).

Construction and purification of human Pol μ and mutant versions

Site-directed mutagenesis by single PCR with oligonucleotides containing the desired mutation was performed on the over-expression plasmid pRSETA-hPol μ (15). The oligonucleotides used were the following:

Y141F (5'TGGATGCCTGCCTTTGCCTGCCAGCGC),
Y141S (5'TGGATGCCTGCCTCTGCCTGCCAGCGC),
C143G (5'CCTGCCTATGCCGGCCAGCGCCCTACG),
R145A (5'TATGCCTGCCAGGCCCTACGCCCTC),
R145K (5'TATGCCTGCCAGAAACCTACGCCCTC),
N153G (5'CTCACACACCACGGCACTGGCCTCTCC),
R446G (5'CAGCGGGAGCTGCGCGGCTTCAGCCGGAAGGAG),
T147A (5'GCCTGCCAGCGCCCTGCGCCCTCACACAC),
T147E (5'GCCTGCCAGCGCCCTGAGCCCTCACACAC).

DNA constructs were sequenced and transformed in *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS (Stratagene). Wild-type and mutant Pol μ variants were over-expressed and purified in an Äkta Purifier FPLC system (GE Healthcare) with the following protocol: the cleared bacterial lysate was loaded on a heparin column followed by an SP Sepharose column. The selected fractions were then loaded on a HiPrep Sephacryl 26/60 to eliminate contaminant nucleases. The eluted fractions containing highly purified protein were concentrated and stored at -80°C .

Construction and purification of human Pol λ and mutant versions

Site-directed mutagenesis by a single PCR with oligonucleotides containing the desired mutation was performed on the over-expression plasmid pET22b-Pol λ (16). The oligonucleotides used were the following:

W239Y (5'CCTGCTGTCTGGATAAGTATGTCTGTGCACAGCCC),
W239G (5'CCTGCTGTCTGGATAAGGGGGTCTGTGCACAGCCC),

C241S (5'GTCCTGGATAAGTGGGTCAGTGCACAGCCCTCAAGC),
C241G (5'GTCCTGGATAAGTGGGTCGGTGCACAGCCCTCAAGC),
Q243R (5'GTGGGTCTGTGCACGGCCCTCAAGCCAGAAGGCG),
Q243G (5'GTGGGTCTGTGCAGGGCCCTCAAGCCAGAAGGCG).

Over-expression of wild-type and the desired mutants of Pol λ was carried out in *E. coli* BL21-pRIL (Stratagene) as described (16). DNA in the cleared bacterial lysate was precipitated with 0.3% polyethyleneimine and sedimented by centrifugation. The supernatant was precipitated with ammonium sulphate to 35% saturation to obtain a polyethyleneimine-free protein pellet. Further purification was conducted on a Akta Purifier FPLC system (GE Healthcare). The pellet was resuspended in Buffer A and diluted to 0.2 M NaCl. Then it was filtered and applied to a 5 ml of HiTrap Heparin column. The eluted fractions containing the protein of interest were loaded in a 1.7 ml of Mono S Sepharose column. The resulting fractions containing the protein of interest were diluted in Buffer A to 0.2 M NaCl and loaded again in a 5 ml of HiTrap Heparin column. The final pooled fractions were stored at -80°C in 50% glycerol.

DNA polymerization and NHEJ assays

Several DNA substrates, containing 5 nM 5'-P-labelled primers, were incubated at 30°C with the indicated polymerase in the presence of dNTPs and activating metal ions. The concentrations of each of these components, as well as the incubation times, are indicated in the figure legends in each case. The reaction mixture, in 20 μl , contained 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM dithiothreitol (DTT), 4% glycerol and 0.1 mg/ml bovine serum albumin (with the addition of 10% PEG 8000 in the case of Pol λ in NHEJ assays). After incubation, reactions were stopped by adding gel-loading buffer [95% (v/v) formamide, 10 mM EDTA, 0.1% (w/v) xylene cyanol and 0.1% (w/v) bromophenol blue] and analysed by 8 M urea/20% PAGE and autoradiography. When indicated, we used ddNTPs instead of dNTPs to limit incorporation to a single nucleotide on the 3'-end of the labelled oligonucleotide.

Electrophoretic mobility shift assays

Electrophoretic mobility shift assays (EMSAs), used to analyse the interaction with gapped-substrates and NHEJ intermediates, were performed in a final volume of 12.5 μl , containing 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.1 mg/ml bovine serum albumin, 1 mM DTT, 4% glycerol, 5 nM labelled DNA and different concentrations of the indicated proteins. After incubation for 10 min at 30°C , samples were mixed with 3 μl of 30% glycerol and resolved by native gel electrophoresis on a 4% polyacrylamide gel (80:1 [w/w] acrylamide/bisacrylamide). Gels were dried, and labelled DNA fragments were detected by autoradiography.

In vitro kinase assays

Phosphorylation was carried out in a final volume of 20 μl of containing kinase buffer [50 mM Tris (pH 7.5), 10 mM MgCl_2 , 1 mM EGTA, 2 mM DTT, 0.01% Brij 35, 100 μM ATP and 0.3 μCi of $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$], in the presence of

substrate (either Histone H1 or 700 ng of Pol μ) and five units of the indicated Cdk/cyclin complexes (New England Biolabs). Reactions were carried out for 30 min at 30°C , and the proteins were separated on a 10% SDS-PAGE. Reactions were stopped by addition of loading buffer and boiling for 2 min at 95°C . The gel was stained with Coomassie Brilliant Blue, dried and exposed on an X-ray film.

Amino acid sequence comparisons and 3D modelling

Multiple alignments of different DNA polymerases were done using the program MULTALIN (<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/>). The different conformations of the studied residues, motifs and domains in the X family polymerases were analysed with the software MacPymol (<http://delsci.com/macpymol/>).

RESULTS

The brooch: a closed conformation of the Pol μ polymerase core is optimal for NHEJ

Despite the lack of enough structural information regarding Pol μ catalytic mechanism, comparison of the existing structures and multiple amino acid sequence alignments guided us in the identification of an amino acid sequence that is present in the catalytic core of Pol μ , TdT and Pol λ , but absent in Pol β . The brooch is formed by the five amino acids Tyr¹⁴¹, Ala¹⁴², Cys¹⁴³, Gln¹⁴⁴ and Arg¹⁴⁵ (YACQR) in Pol μ s and TdTs, and it is extraordinarily conserved among different species (Figure 1A). In Pol λ s, the conserved sequence is slightly different but includes again five similar amino acids: Trp²³⁹, Val²⁴⁰, Cys²⁴¹, Ala²⁴² and Gln²⁴³ (WVCAQ, see Figure 1A). This sequence, located at the very N-terminal part of the core, preceding the 8 kDa domain, was not included in any of the Pol λ structures that have been crystallized (17). Fortunately, the crystallized murine Pol μ core did include the brooch, and therefore we could delineate its specific interactions with residues located in the thumb subdomain (Figure 1B): Tyr¹⁴¹ interacts directly with thumb residues Gln⁴⁵² and Glu⁴⁵³ (Lys⁴⁵⁰ and Glu⁴⁵¹ in human Pol μ) through their side chain, and with the brooch residue Gln¹⁴⁴ (in this case through the backbone of both residues). Arg⁴⁴⁸ (Arg⁴⁴⁶ in human Pol μ) is also part of this network of interactions and directly stacks against Tyr¹⁴¹. Moreover, the brooch residue Arg¹⁴⁵ is interacting with two other residues (Pro¹³⁹, Ala¹⁴⁰) and with Ser¹⁸⁴ located at the 8 kDa subdomain, thus helping to maintain the general architecture of the brooch. We speculate that these interactions would be involved in the maintenance of the closed conformation of the core and consequently in the correct positioning of the DNA, specifically during the first step of a NHEJ reaction in which the protein has to interact with two separate DNA substrates, as modelled in Figure 1B. A constitutively closed core could be critical to correctly position the downstream DNA end, which would be in any case bound by its 5'-phosphate group to the 8 kDa domain of the polymerase, but also has to interact with protein residues for fine-tuned orientation during

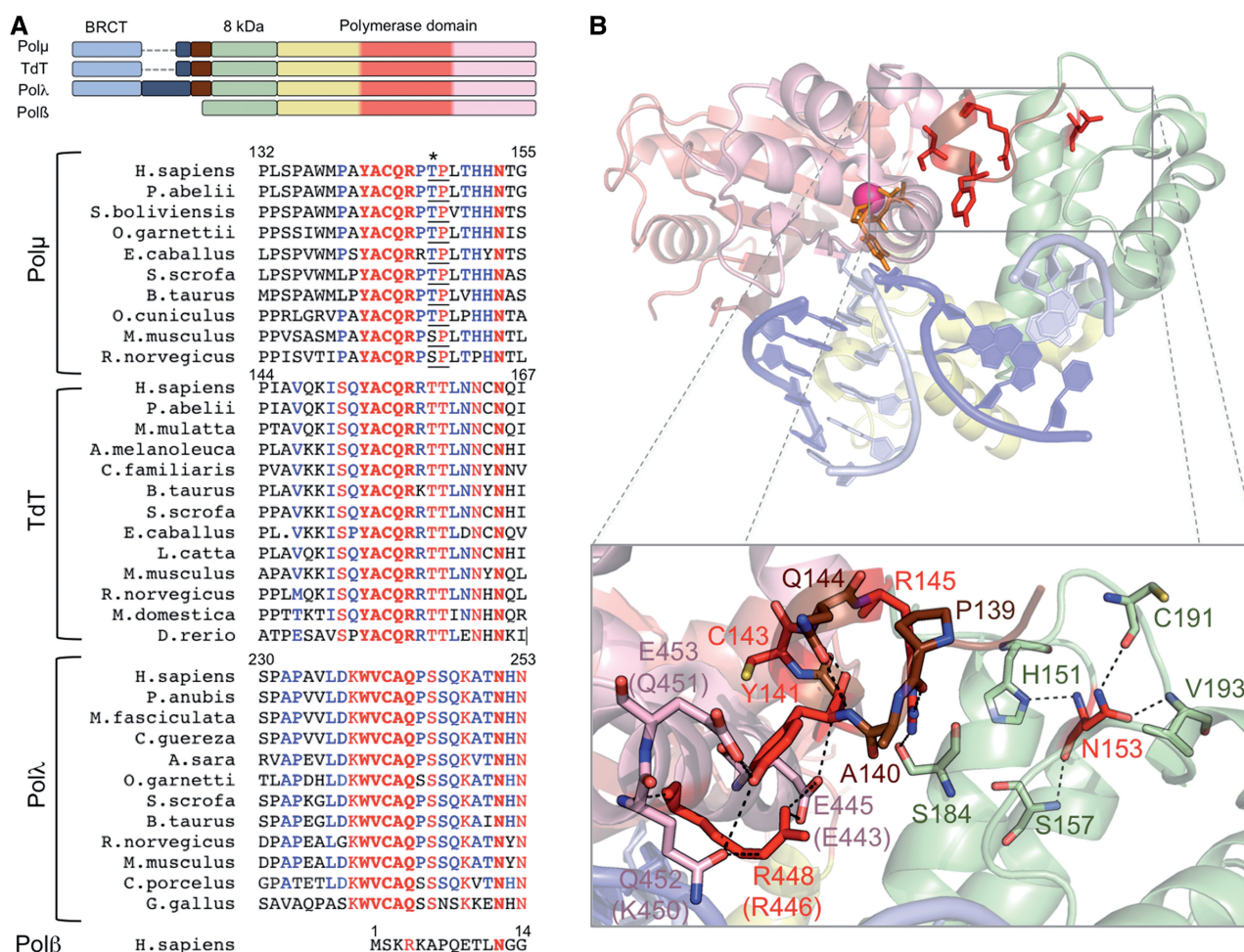


Figure 1. The brooch: amino acid conservation and implications for the closing of the polymerase core. **(A)** Top: schemes showing the domain organization of the human PolXs. The subdomains in the polymerase domain are coloured as follows: fingers in yellow, palm in red and thumb in pink. Bottom: multiple sequence alignment of Polλs, Polμs and TdTs of different species and human Polβ. Invariant residues inside each group are shown in red, conserved residues in blue. The brooch and the invariant asparagine equivalent to Polμ Asn¹⁵³ are highlighted in bold. Asterisk indicates a Cdk phosphorylation residue at the minimal consensus sequence (TP/SP; underlined). **(B)** Cartoon representation of the murine Polμ ternary complex with the domains coloured as in **(A)**. Labels of some residues are given for both mouse and human (in parentheses) counterparts, as they differ. The DNA substrate is shown in sticks, dark blue for the template strand and light blue for the primer and downstream strands. One nucleotide of the template strand has been eliminated to mimic a NHEJ intermediate formed by two 3'-protruding substrates. Residues from the brooch are shown in brown, unless those subjected to mutagenesis, which are shown in red sticks; residues contacting them directly are shown in the colour of the subdomain they belong to.

end-bridging. Therefore, if the protein architecture were not properly maintained, these interactions with the downstream side of the break (and also with the upstream side) would be less stable due to the constant 'breathing' of the polymerase core: the correct positioning of the two 3'-protrusions in the active site of the polymerase would not be achieved—lowering the efficiency of the NHEJ reaction.

To test this idea, we mutated each of the three most conserved residues in the brooch of human Polμ. The point mutations were designed as follows: Tyr¹⁴¹ was mutated either to phenylalanine (Y141F) to maintain the overall shape of the amino acid while eliminating the reactive group, or serine (Y141S) to get the opposite result; Cys¹⁴³ was mutated to glycine (C143G), and Arg¹⁴⁵ was mutated to either lysine (R145K), to maintain the positive charge, or alanine (R145A), to

eliminate any function of this residue. We also targeted another residue, Asn¹⁵³, which might be indirectly involved in maintenance of brooch conformation. Asn¹⁵³ is located in the 8 kDa domain, and although it is not establishing direct interactions with any residue of the brooch or the thumb subdomain, it is part of a network of interactions [His¹⁵¹, Ser¹⁵⁷, Cys¹⁹¹ (Ser¹⁹¹ in human Polμ), Val¹⁹³] that maintains the general conformation of this part of the 8 kDa domain (Figure 1B). This structural function seems to be crucial, given the invariant conservation of this residue among Polμs, TdTs and Polλs of different species, and also in human Polβ (Figure 1A). We mutated Asn¹⁵³ to glycine (N153G) to test whether this destabilization affects the function of the brooch.

The purified mutants were firstly analysed on template-dependent polymerization activity assays. Gap-filling activity by these mutants was mildly affected (both in

efficiency and nucleotide insertion fidelity) when compared with wild-type Polμ (Figure 2A and C). We next tested the activity of these mutants on either complementary or non-complementary NHEJ substrates (18). NHEJ activity on complementary ends was strongly reduced in all cases: mutants in Tyr¹⁴¹, Cys¹⁴³ and Asn¹⁵³ barely reached 40% of wild-type activity, whereas mutants R145A (16%) and R145K (3%) were much strongly affected (Figure 2B, left panels, and C). In the case of the non-complementary substrates, the activity of all the mutants was null when performing the assays in the conditions used for wild-type Polμ (Figure 2B, right panels, and C). When assayed with a 100-fold higher ddNTP concentration (Supplementary Figure S1E), we could detect some activity in the case of mutants Y141F (conservative mutation) and N153G, much less with mutants Y141S and C143G, and still none with mutants R145A and R145K. Therefore, our results demonstrate the relevance of the brooch, and by extrapolation, of a closed conformation of Polμ, during NHEJ. Moreover, brooch residue Arg¹⁴⁵ is highly specific for NHEJ reactions: although the two mutants at this residue reached 70% of wild-type gap-filling activity, polymerization on NHEJ substrates, either complementary or non complementary, was very low or undetectable (Figure 2B and C).

A closed conformation of the Polμ core promotes binding to NHEJ substrates

As a control, we first tested the binding of the brooch mutants to the same gapped DNA substrate used in the activity assays, and all displayed similar levels of DNA binding as the wild-type, as established by EMSA analysis of the enzyme/DNA binary complex formed (Figure 3A). These results are in agreement with the wild-type-like gap-filling activity shown by these mutants (Figure 2A). To test whether the inability of the brooch mutants to perform NHEJ of incompatible ends was primarily due to some defect in binding/bridging DNA ends with short, non-complementary, 3'-protrusions, we carried out EMSA experiments with the same 3'-protruding ends used in the NHEJ assays. Figure 3B shows that all the mutants displayed a similar binding to a single DNA end as the wild-type Polμ (lower shifted band); this can be expected, as binding to one end is largely dependent on its 5'-P pocket. Interestingly, wild-type (WT) Polμ produces a super-shifted band that must be a 2:1 (DNA:enzyme) synaptic complex for the following reasons: EMSA on gapped substrate showed that Polμ binds the substrate in a unique way (only one sharp retarded band), with the enzyme nested at the gap position flanked by the 5'-P [as confirmed by footprinting assays (18)], but not at the blunt ends of the DNA molecule. Extrapolation of this knowledge to the case of the NHEJ substrate implies that Polμ must be binding the 3'-protruding side of the substrate (through its 5'-P group), and not the blunt end. This rules out the possibility that more than one polymerase is stably bound to a single DNA molecule, producing the super-shift. Then, the super-shifted band must contain two DNA ends. As any

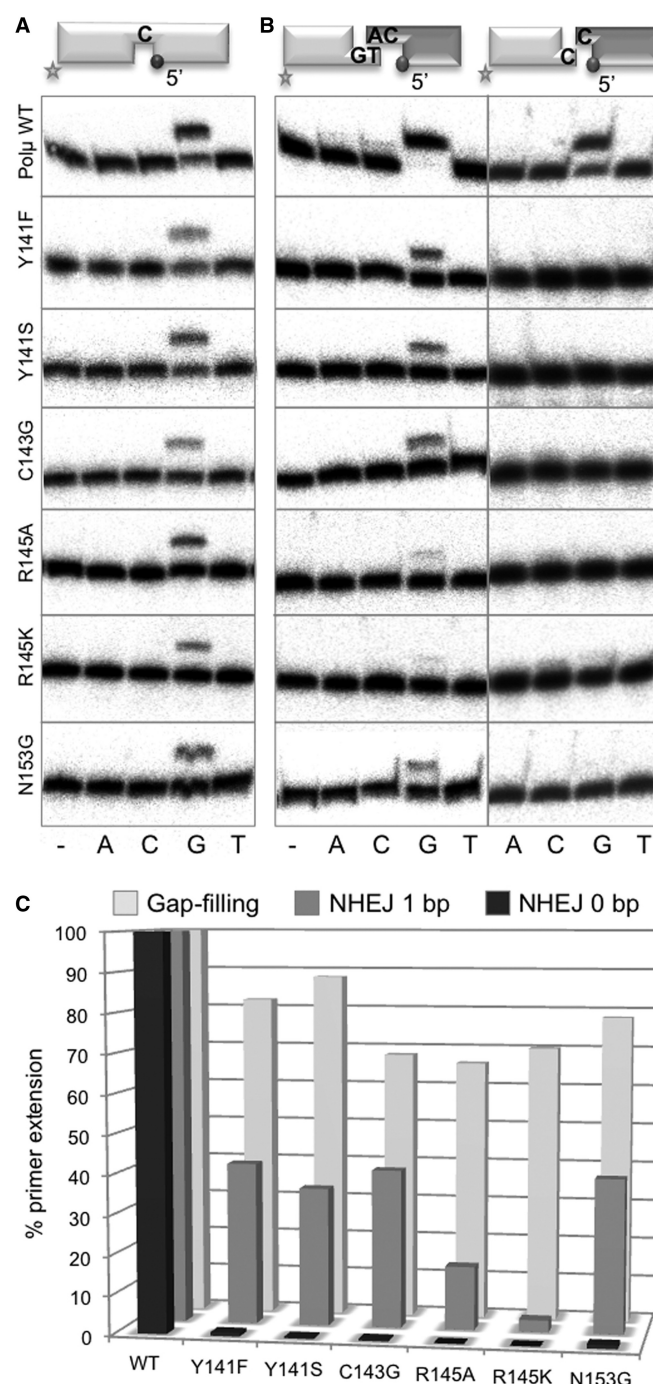


Figure 2. Mutagenesis of the brooch specifically affects the end-joining activity of Polμ. (A) Gap-filling reactions were performed for 30 min at 30°C with wild-type Polμ and the indicated mutants (25 nM) using a gapped substrate containing the oligonucleotides SP1C, T13C and DG1-P. dNTPs were added separately at 10 nM in the presence of 2.5 mM MgCl₂. (B) NHEJ reactions were performed with 200 nM Polμ and using two sets of substrates: the labelled substrates contain 1TG or 1C and 1D-NHEJ, and the cold substrates, either 2AC or 2C and 2D-NHEJ. The dark spheres indicate the presence of a 5'-P group, which forces binding of this substrate to the 8 kDa domain of Polμ and thus its usage as the downstream part of the break. ddNTPs were added separately at 10 μM in the presence of 2.5 mM MgCl₂. (C) Quantification of primer extension by wild-type Polμ and the indicated mutants in gap-filling and NHEJ reactions.

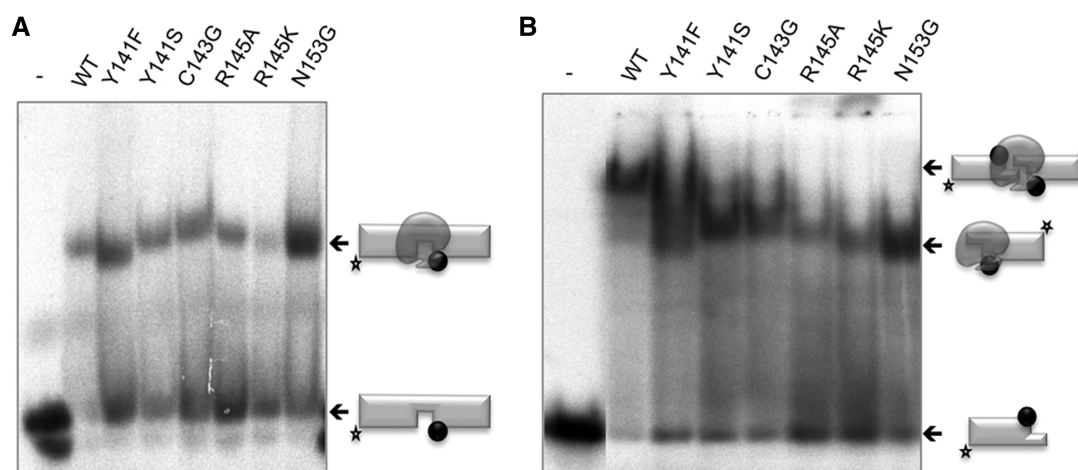


Figure 3. A closed conformation of the polymerase core promotes binding to NHEJ substrates. (A) EMSA was performed for the wild-type Polμ and the indicated mutants (200 nM) using a gapped substrate containing the oligonucleotides SP1C, T13C and DG1-P. (B) EMSA was performed for the wild-type Polμ and the indicated mutants (600 nM) using a 3'-protruding substrate formed by hybridization of 1TG with 1D-NHEJ.

of these two ends can provide one binding site to the polymerase, the super-shifted band could correspond to synapses involving two different complexes (either 2:1 or 2:2; DNA:prot). It could be envisioned that two polymerase molecules, each bound to one DNA end, could bring them together to form a 2:2 complex as the one observed in the bacterial NHEJ machinery (19). Nevertheless, the footprinting size (9 nt) produced by a single Polμ molecule (18), observed also in the structure of Polμ bound to a gapped substrate (PDBID: 2IHM), makes a single Polμ monomer competent to bridge the two sides of the break at the same time; conversely, the formation of a 2:2 complex would be hindered owing to sterical reasons. Thus, we infer that the super-shifted band does correspond to a 2:1 (DNA:pol) synopsis. Strikingly, none of the mutants were able to fully reproduce the second super-shifted band that corresponds to the synopsis. Mutant Y141F had a moderate defect in DNA binding in agreement with its residual activity. Mutation of Asn¹⁵³ is clearly not affecting the general structure of the 8 kDa domain, as binding to the 5'-P group is not compromised; thus, its structural role must have to do with maintaining the framework needed for a correct functioning of the brooch. All these results reinforce the idea that the brooch is not essential to bind the template/downstream (T/D) DNA end, a task that relies on the recognition of the 5'-P by the 8 kDa domain (18). However, it is likely that the brooch is important for the correct orientation of the 3'-protrusion acting as a template. If that end is not correctly positioned, synopsis of the second end would be unstable, and catalysis would be impaired. This is especially true for non-complementary DNA ends, where the ability of Polμ to align the two 3' overhangs, one as primer and the other as template, is crucial to achieve a correct synopsis.

We propose that the brooch is required to keep the closed conformation necessary for correct binding of NHEJ substrates and further catalysis. Although visual proof such as crystallization of the wild-type protein and

comparison with selected mutants is unavailable, we took advantage of the fact that the 'brooch' domains are connected by linker regions that are possibly exposed to the solvent, therefore accessible to proteases. We performed partial proteolysis analyses on both Polμ and Polλ and a selection of strongly affected mutants to determine whether these mutations produce a defective close conformation. As shown in [Supplementary Figure S2](#), both wild-type Polμ and Polλ showed a pattern of degradation that includes the appearance of a band corresponding to the polymerase core (red asterisks), lacking the Breast cancer gene 1 C-Terminal domain (BRCT domain) and the flexible Ser/Pro linker. Mutations on specific residues of the brooch changed this pattern: this band was less obvious, and a new band was formed (arrowheads). By using mass spectrometry, we have demonstrated that this new proteolytic fragment, running in a position close to the polymerase core, has lost the N-terminus of the protein ([Supplementary Figure S2B](#)). The appearance of this new band can only be interpreted as a change in the protease sensitivity of the linker, due to a defective brooch function that leads to a change of conformation of the polymerase in this region.

Mutation of Arg⁴⁴⁶ in human Polμ mimics disruption of the brooch

A specific arginine residue, located in the thumb subdomain, was predicted as important for the brooch function: in the murine structure, Arg⁴⁴⁸ interacts with Gln⁴⁵² and Glu⁴⁵³, also in the thumb, and stacks against Tyr¹⁴¹, part of the brooch (see [Figure 1B](#)). Arg⁴⁴⁸ forms part of a positively charged α-helix that contains four arginine residues (Arg⁴⁴⁴, Arg⁴⁴⁷, Arg⁴⁴⁸ and Arg⁴⁵¹) oriented towards the negatively charged phosphate backbone of the template strand (data not shown). Arg⁴⁴⁸ (Arg⁴⁴⁶ in human Polμ) is the only residue of these four that is exclusively conserved among Polμs and TdTs of different species ([Figure 4A](#)). Human Polμ mutant R446G was obtained to determine how Arg⁴⁴⁶

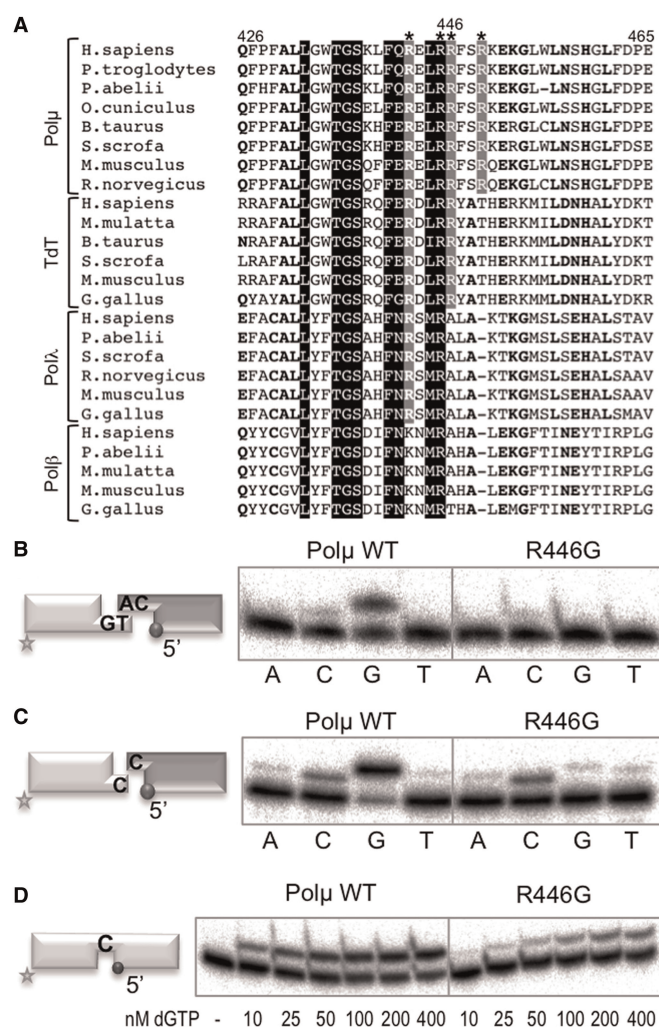


Figure 4. Mutation of the interacting thumb residue Arg⁴⁴⁶ mimics disruption of the brooch. (A) Multiple sequence alignment showing the region corresponding to helix N in the four X family polymerases from different species. Numbers indicate the residues in the human Polμ sequence. The four conserved arginines (Arg⁴⁴⁴, Arg⁴⁴⁷, Arg⁴⁴⁸ and Arg⁴⁵¹ in mouse Polμ) oriented towards the negatively charged phosphate backbone of the template strand are boxed in grey or black and indicated with an asterisk. Arg⁴⁴⁶ in human Polμ is numbered. (B) NHEJ reactions were performed for 30 min at 30°C with 400 nM of the indicated proteins and using two sets of substrates: the labelled substrate contained 1TG and 1D-NHEJ and the cold one 2AG and 2D-NHEJ. Each of the four ddNTPs (100 μM) was added in the presence of 2.5 mM MgCl₂. (C) NHEJ reactions were performed as in (B) but using non-complementary DNA substrates, the labelled one containing 1C and 1D-NHEJ, and the cold one containing 1C and 2D-NHEJ. (D) Gap-filling reactions were performed for 30 min at 30°C with the indicated proteins (100 nM) using a gapped substrate containing SP1C, T13C and DG1-P. dGTP was added separately at the indicated concentrations in the presence of 2.5 mM MgCl₂.

might be contributing to the function of the brooch in Polμ. When tested in NHEJ substrates, the only incorporation observed with mutant R446G corresponds to error-prone insertions, a result of the terminal transferase activity of Polμ, whereas the error-free templated insertion is only observed with the wild-type enzyme in either complementary (Figure 4B) or non-complementary DNA ends (Figure 4C). As a control, we tested R446G in polymerization on a 1 nt gap, and the mutant displayed

a level of activity that was 60% wild-type (Figure 4D), a minor defect compared with the one shown in NHEJ substrates. These results clearly emphasize the importance of a perfectly orchestrated end synapsis during NHEJ, in which all the elements (two DNA ends and incoming nucleotide) must be stabilized by the polymerase in proper register for catalysis.

The brooch in Polμ may be a Cdk phosphorylation target

Inspection of the sequence of Polμ revealed the existence of a possible Cdk phosphorylation site very close to the brooch, at residue Thr¹⁴⁷ (indicated with an asterisk in Figure 1A). This site contains the minimal consensus (TP, Thr-Pro) and is highly conserved among Polμs from different species. In murine Polμ, Ser¹⁴⁷ occupies this position, and in the crystal structure, Ser¹⁴⁷ was shown to be indirectly contacting residue Arg¹⁴⁵ of the brooch and acting itself as a bridge between the 8 kDa domain and the thumb subdomain, through direct contacts with Gln⁴⁹³ and Asn⁴⁹⁵ (Figure 5A). *In vitro* kinase assays with the wild-type human Polμ and mutant T147A were carried out with two different complexes: Cdk2/cyclin A (associated with S phase) and Cdc2/cyclin B (important for G2/M transition and progression through M phase). Histone H1 was used as a positive control of phosphorylation. As shown in Figure 5B, a clear phosphorylation signal could be observed with the two cyclins (although the phosphorylation signal is more intense in the case of Cdk2/cyclin A), meaning that Polμ is a substrate of Cdk complexes and thus could be cell-cycle regulated. The second conclusion is that the Cdk site at Thr¹⁴⁷ does not seem to be the main Cdk phosphorylation site in the sequence of Polμ, in agreement with our recent data (Esteban V., Martin MJ. and Blanco L., manuscript under revision). It was not possible to detect this putative phosphorylation site by mass-spectrometry after *in vitro* phosphorylation, as none of the peptides detected contained this site. However, and to elucidate the possible impact of phosphorylation-mediated regulation in a region so closely related with the brooch, the phospho-mimicking mutation T147E was obtained and tested it on a range of *in vitro* assays. As expected, mutants T147E and T147A displayed a wild-type phenotype in 1 nt gap-filling reactions (Figure 5C). On the other hand, when tested for NHEJ on non-complementary ends, the activity of mutant T147E was completely abolished, whereas the control mutation to alanine did not produce any detectable effect (Figure 5D). These results lead us to propose that the maintenance of a closed conformation of the polymerase core, which impacts highly specialized functions of Polμ, might be regulated in a cell-cycle-dependent manner. This hypothesis needs to be further tested *in vivo*, as our data cannot yet confirm the existence of a functional Cdk site at this position and its implications for Polμ activity during the cell cycle.

The brooch of Polλ improves end-bridging efficiency and binding to long DNA gaps

As previously indicated, the brooch is also conserved in Polλ, but its function during the catalytic cycle and its

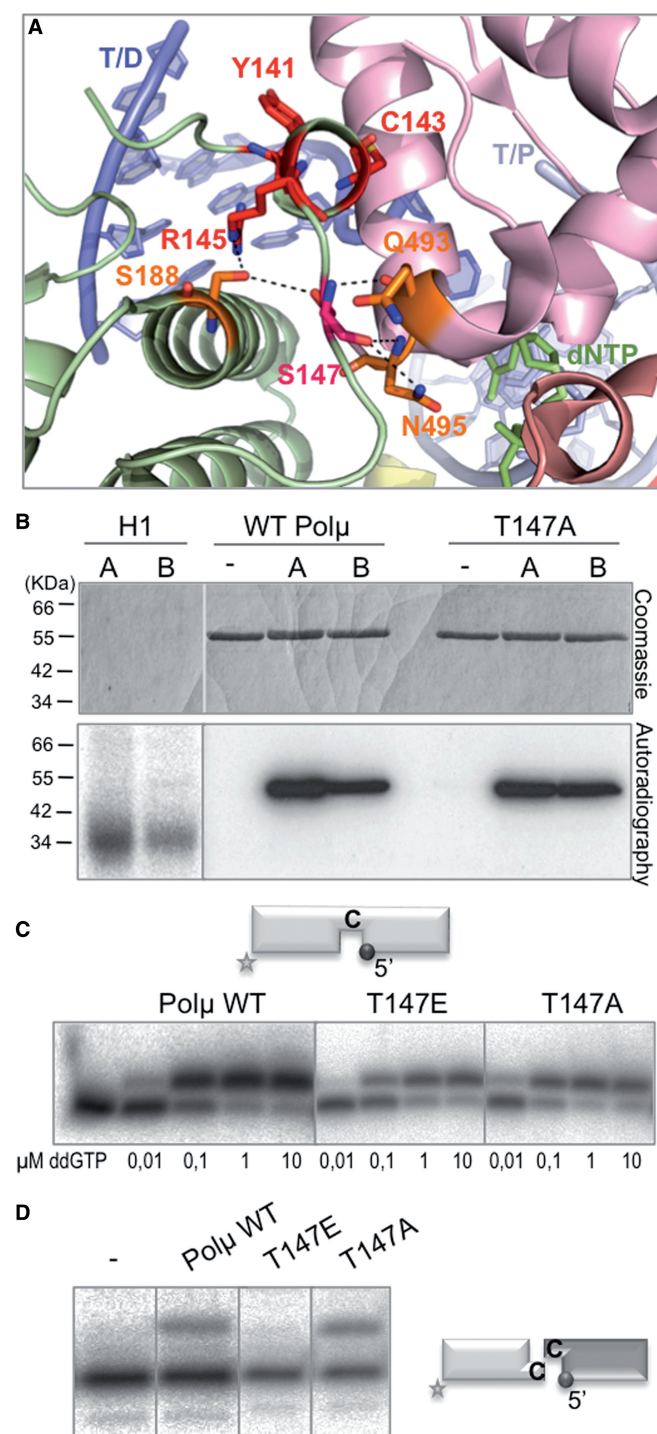


Figure 5. The brooch in Polμ may be regulated via Cdk phosphorylation. (A) Cartoon representation of the murine Polμ ternary complex with the domains coloured as in Figure 1A. Residues of the brooch are shown in red sticks, Ser¹⁴⁷ (equivalent to Thr¹⁴⁷ in human Polμ) in hot pink and residues contacting it directly in orange. (B) *In vitro* Cdk phosphorylation assay of histone H1 (100 ng), wild-type Polμ and T147A mutant (700 ng) was carried out as described in 'Materials and Methods' section. Two different Cdk complexes were used in this assay, Cdk2/cyclin A (A) and Cdk2/cyclin B (B). The amount of the different proteins was visualized by Coomassie staining, the labelled portion was detected by autoradiography. (C) Gap-filling reactions were performed for 30 min at 30°C with the indicated proteins (25 nM) using a gapped substrate containing SP1C, T13C and DG1-P. As indicated, a range of ddGTP concentrations was used in

structural and mechanistic implications have not been studied to date. Thus, we mutated the WVCAQ brooch as follows: Trp²³⁹ was changed either to tyrosine (mimicking the Polμ sequence) or glycine; Cys²⁴¹ was mutated to either serine or glycine (having a similar size); Gln²⁴³ was changed either to arginine (to modify the charge of the side chain while maintaining its size and structure) or glycine. As Polλ needs complementarity to achieve end bridging (20), we used substrates with a limited (3 bp) microhomology. These reactions were performed in the presence of manganese, a metal cofactor known to increase the rate of catalysis by stabilizing the nucleotide in the active site (21). Under these conditions, the mutants showed <30% of wild-type activity, with the exception of W239Y and Q243R (Figure 6A and Supplementary Figure S3C).

Interestingly, Polλ was much more efficient (4–5-fold) during NHEJ of DNA ends with 4 bp of complementarity, thus allowing the efficient use of magnesium as cofactor (compare Supplementary Figure S3C and D, WT panels). Even using this more favourable connection, and perhaps a more physiological metal cofactor, the mutants (with the exception of W239Y) displayed very low (C241G and Q243R) or even undetectable (W239G, C241S, Q243G) levels of NHEJ activity compared with the wild-type enzyme (Figure 6B and Supplementary Figure S3D). However, when the mutants were tested on a 1 nt gap as the most favourable substrate, their activity was only slightly affected (to a much lesser extent than in NHEJ reactions; Figure 6C and Supplementary Figure S3A and B). As longer gaps can eventually arise as NHEJ intermediates to be handled by Polλ, the brooch mutants were also tested for gap filling on a 5 nt gapped substrate bearing a 5'-P group. As shown in Figure 6D (left panels), the activity of mutants W239G, C241S, C241G and Q243G was significantly affected. Moreover, the activity of the brooch mutants was further reduced when tested on DNA substrates with a lower binding affinity, such as a 5 nt gap lacking the 5'-P group (Figure 6D, right panel). This defective activity of some brooch mutants was primarily due to an impaired binding to long gaps as demonstrated by EMSA: all the mutants were perfectly able to stably bind a 1 nt gapped substrate (Supplementary Figure S4A), whereas their binding to the 5 nt gap was affected (Supplementary Figure S4B), except for mutants W239Y and Q243R, in agreement with their high-activity levels. Formation of a more stable ternary complex in this 5 nt gap, which requires providing the first complementary nucleotide in the EMSA assays, but also the positioning of four template bases in the 'scrunching' pocket (22), was even more difficult for the mutants (Supplementary Figure S4C). Interestingly, the 'scrunching' pocket is located between

Figure 5. Continued

the presence of 2.5 mM MgCl₂. (D) NHEJ reactions were performed for 30 min at 30°C with 200 nM of the indicated proteins and using two substrates: the labelled substrate contained 1C and 1D-NHEJ, and the cold one contained 2C and 2D-NHEJ. ddGTP was added at 10 μM in the presence of 2.5 mM MgCl₂.

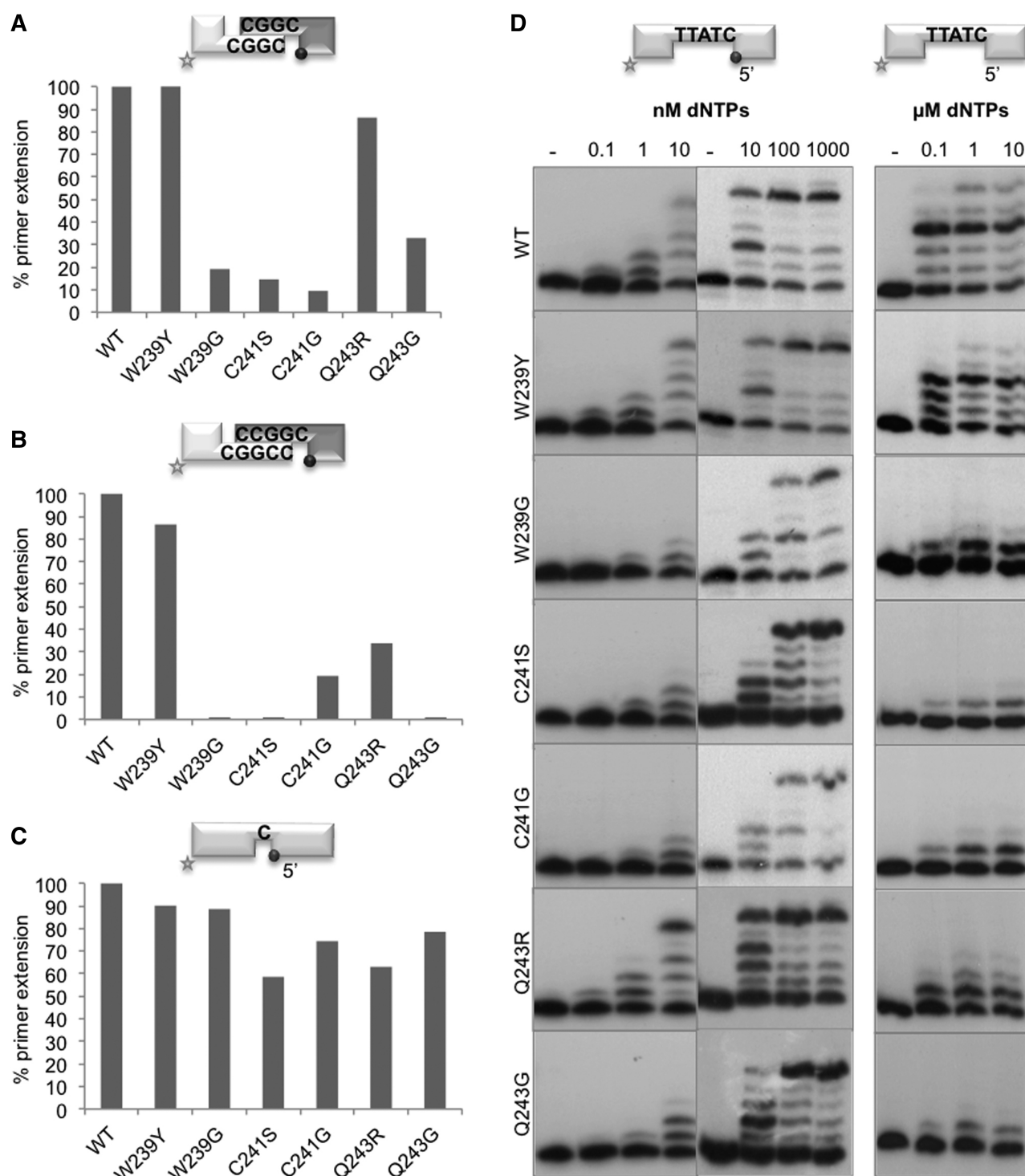


Figure 6. The brooch of Polλ improves end-bridging efficiency and binding to long DNA gaps. (A) NHEJ reactions were performed with the wild-type Polλ and the indicated mutants (500 nM) in the presence of 1 μM ddGTP and 0.1 mM MnCl₂ at 30°C for 60 min. Two separate sets of substrates were used: the labelled substrates contain D3 and D1, and the cold substrates, D4 and D2-P. (B) NHEJ reactions were performed with Polλ and the indicated mutants (500 nM) in the presence of 1 μM ddGTP and 2.5 mM MgCl₂ at 30°C for 60 min. Two separate sets of substrates were used: the labelled substrates contain D3+C and D1, and the cold substrates contain D4GC and D2-P. (C) Gap-filling reactions were performed with the wild-type Polλ and the indicated mutants (50 nM) in the presence of 10 nM ddGTP and 2.5 mM MgCl₂ using a gapped substrate containing the oligonucleotides SP1C, T13C and DG1-P at 30°C, 20 min. (D) Polymerization reactions were performed with the wild-type Polλ and the indicated mutants (50 nM) in the presence of 2.5 mM MgCl₂ at 30°C for 20 min, using two different DNA substrates: GAP5-P (left panels) containing SP1C, T18 and DG5-P and GAP5-OH (right panel) containing SP1C, T18 and DG5. dNTPs concentration is indicated. After denaturing electrophoresis, the labelled fragments were detected by autoradiography.

the 8 kDa domain and the thumb subdomain, very close to the brooch. Thus, according to our mutational data, the Pol λ brooch could be involved in the architecture of the scrunching pocket, contributing to Pol λ ability to bind the ‘yet-to-be-copied’ downstream nucleotides.

In summary, these results show that the Pol λ brooch is important for its NHEJ function, as described for Pol μ , but it is also particularly important to bind substrates containing gaps longer than 1 nt, which require a functional scrunching site.

DISCUSSION

Compelling evidence indicates that the NHEJ pathway minimizes loss of genetic material by using any template available: the overhangs formed during alignment of DSBs are usually filled in, allowing retention of the maximum sequence possible (23–25). The NHEJ pathway takes advantage of highly specialized polymerases, capable of dealing with two DNA ends at once: one providing a primer strand with a protruding 3'-OH, and another that provides a recessive 5'-P and a template strand, also 3'-protruding. Thus, for this task, the polymerase must extend the primer using a templating base provided *in trans*: ‘alignment based gap fill-in’. In the case of family X polymerases, the ability to act during NHEJ is dictated by their template dependence (26), which relies on structural differences among the four polymerases.

Some of the DNA polymerases belonging to the X-family contain non-catalytic regulatory domains, such as an N-terminal BRCT domain implicated in protein–protein (27) and protein–DNA interactions (28,29), followed by a flexible linker known as the Ser-Pro domain. In the past few years, data from different laboratories have indicated the possible implication of the non-catalytic domains, and specifically the Ser-Pro domain, in the regulation of the activity of the polymerase domain: first, a deletion mutant of the first 244 amino acids in Pol λ (BRCT and Ser-Pro domains) was shown to display stronger strand-displacement than the wild-type Pol λ (30); second, pre-steady-state kinetics comparing full-length Pol λ with a truncated form that again lacks the first 244 amino acids indicated that this Ser-Pro domain confers an increase in fidelity by lowering the incorporation rate constants of incorrect nucleotides, thus allowing Pol λ to reach the fidelity levels of Pol β (31). However, all the biochemical studies leading to the conclusion that the Ser-Pro domain is implicated in the regulation of the catalytic activity of the polymerase have been performed on deletion mutants, which not only lacked the Ser-Pro (and BRCT) domain but also a previously unnoticed region of the protein that has been studied in depth in the work presented here: the brooch, present in Pol λ , Pol μ and also TdT, but absent in Pol β .

The brooch is a conserved N-terminal extension of the 8 kDa domain of eukaryotic Pol μ , TdT and Pol λ , but it is also highly conserved in other PolXs from different species, even from different kingdoms of life. Figure 7 shows the sequence consensus of different types of

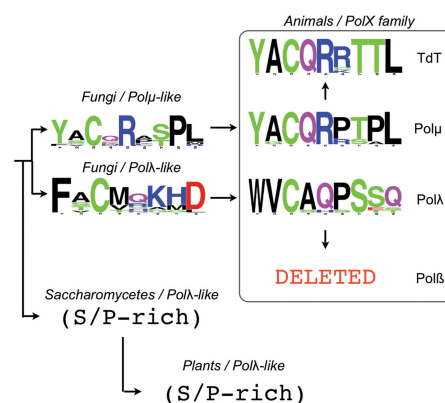


Figure 7. Brooch ancestry. Sequence logo representations and evolution of the brooch sequence in groups of species belonging to different eukaryotic kingdoms: animals, fungi and plants. The sequences used for generating the logos are indicated in [Supplementary Figure S5](#).

brooch, indicating the conserved residues in each case (full sequence alignments from which these logos were generated are shown in [Supplementary Figure S5](#)). According to the sequence conservation of the brooch, the PolXs found in *Ascomycota* can be divided into three groups: Polμ-like, Polλ-like and PolXs from Saccharomycetales. Strikingly, PolXs from Saccharomycetales (as Pol4 from *Saccharomyces cerevisiae*) do not contain a brooch, and the Ser-Pro domain is followed immediately by the 8 kDa domain. Pol λ sequences from plants also lack this sequence, possibly indicating an evolutionary relationship amongst these two groups. In the case of Polμs from animals, the sequence is almost invariant (YACQR), as in the case of TdTs (Figure 7 and [Supplementary Figure S5](#)). In the case of Polλs from animals, the sequence is different (WVCAQ), but it is equally conserved, whereas in Polβs, the brooch has been apparently lost, together with the BRCT and Ser-Pro domains, in agreement with a more specific role of Polβ in base excision repair, not dealing with DSBs as its family siblings.

Taking into account the structural data available for Polμ, we could initially postulate the implication of the brooch in maintaining the constitutively closed conformation of Polμ, TdT and Polλ through the catalytic cycle, whereas Polβ is not constrained by this brooch and allows free motion of the 8 kDa domain with respect to the thumb ([Supplementary Figure S1](#)). Unfortunately, in the case of all the structures solved for Polλ, this small region is missing (a model of the predicted position of the brooch in this polymerase can be seen in [Supplementary Figure S1D](#)). This fact could well explain the 5-fold difference in K_m observed between the full-length Polλ and the crystallized form of the enzyme (16) and also the conformation adopted by the 8 kDa domain in this Polλ structure, which is intermediate between the open and closed conformation of Polβ (PDB IDs: 1BPZ, 1BPY). This lack of the brooch could also affect the results obtained by Fiala *et al.* (31) and Fan *et al.* (30) using truncated mutants, thus not allowing assignment of a specific role for the Ser-Pro domain from their data.

The 8 kDa domain is one of the structural features that allow X family polymerases to bind gapped and NHEJ substrates, and it is located either at the N-terminus (Pol β), or at the N-terminal portion of the polymerase domain (Pol λ , Pol μ , TdT and yeast PolXs), preceded by the Ser/Pro-rich region and/or the BRCT domain. The 8 kDa domain is involved in contacting the downstream 5'-P group (13), and in some of the members of the X family, it bears a dRP-lyase activity, highly related to the BER pathway (32,33) but also needed to process the DNA ends of a 'dirty' DSB. The Pol λ binary structure with a 2nt gap (16) shows that the location of the polymerase domain in a gap is dictated by the binding of the 8 kDa domain to the downstream part of the substrate, and not by interactions with the primer terminus. This observation has implications of great interest for the binding of the polymerase to NHEJ substrates, as 8 kDa-mediated binding would occur, irrespective of the conformation of the 3' end. An extreme example of a situation like this would be a recent structure of the NHEJ polymerase from *Mycobacterium tuberculosis* in which the polymerase is forming a 'pre-ternary' complex (34): the enzyme is binding the downstream side of the break via the 5'-P group and also the incoming nucleotide dictated by the templating base. The active site is poised for catalysis, with both metals A and B present and the residues in their active conformations—all in the absence of a primer strand. In the case of the eukaryotic polymerases, the order of events could be similar during end bridging, as hinted by the Pol λ structure. Therefore, a tightly controlled conformation of the body of the polymerase would help to correctly position all the components needed for catalysis: primer terminus, templating base, incoming nucleotide, metal cofactors and protein side chains building the active site. Accordingly, our mutagenesis results indicate that the most affected reaction when the brooch is disturbed in both Pol μ or Pol λ was end bridging/trans-polymerization. In Pol λ , it is also affecting its 'scrunching' capacities used to deal with long gaps. This brooch is thus 'scrunching'-compatible, probably allowing a certain opening of the 8 kDa domain with respect to the thumb, whereas Pol μ 's might be much more static. On the other hand, the support provided by the brooch was not necessary during 1nt gap filling, an expected result as Pol β , a polymerase specialized in this reaction, does not contain a brooch.

In addition to large-scale domain motions (in Pol β), several side chains in the thumb domain rearrange to assemble the active site. Specifically, the side chains of the Tyr and Phe residues forming the YFTGS motif in Pol β and Pol λ move on binding of the incoming nucleotide, resulting in the correct positioning of the primer terminus for catalysis. This motif is different in Pol μ and TdT (GWTGS), where the equivalent residues are a glycine and a tryptophan, responsible for a decreased discrimination between deoxyribo- versus ribonucleotides (35–37) and a more spacious active site that allows Pol μ to bridge non-complementary ends (38), contrary to Pol β and Pol λ , which largely favour the use of deoxyribonucleotides (8,39). The thumb subdomain is also interacting with the downstream part of the template strand through

the already mentioned α -helix N, which is strongly positively charged in Pol μ . An interaction common to Pol μ and Pol λ is the stacking of the templating base with one of the residues included in this positive path, Arg⁴⁴² in Pol μ and Arg⁵¹⁴ in Pol λ (11,13). The equivalent residue in Pol β is a lysine residue (Lys²⁸⁰) with a similar function. Pol μ has a few minor groove interactions through residue Arg⁴⁴⁵, some of which are mediated by bridging water molecules (13). Arg⁴⁴⁶ of this helix in Pol μ is involved in interactions with the brooch; accordingly, mutation of this residue to alanine had the same effects as mutations in the brooch.

In conclusion, this work describes a small protein sequence (named brooch) that modulates the catalytic cycle of polymerases from the human X family, of main importance for DNA repair reactions such as those occurring during the NHEJ pathway. Pol μ and Pol λ are highly specialized polymerases, singularly suited for their functions: engagement of two different DNA chains and *trans*-directed polymerization (even in the case of very low or inexistent complementarity) with the only objective of fulfilling the most efficient reaction possible with the minimal loss of sequence. The physiological importance of the brooch as a controller of the most specific activities of these enzymes remains an open question of special interest, taking into account the existence of several human single nucleotide polymorphisms affecting residues studied here, such as R145C and N153S in Pol μ , and also of regulatory sites such as the possible Cdk phosphorylation site at Pol μ 's Thr¹⁴⁷, the possible Chk target site at the brooch in TdT (YACQRRTT) and Pol λ 's Ser²⁴⁶, an ATM/ATR target (40). Future studies will focus on understanding the mechanistic and physiological effects of these allelic variants and also the *in vivo* regulation of the brooch.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Data are available at NAR Online.

ACKNOWLEDGEMENTS

The proteomic analysis 'Protein Identification by MS-MALDI-TOF' was carried out in the Cbmso Protein Chemistry Facility, a member of ProteoRed network.

FUNDING

Funding for open access charge: Ministerio de Ciencia y Tecnología Grant [BFU2009-10085] and CONSOLIDER [CSD2007-00015]; and Centro de Biología Molecular 'Severo Ochoa' from Fundación Ramón Areces; the recipients of fellowships from the Comunidad Autónoma de Madrid (to M.J.M. and A.G.B.).

Conflict of interest statement. None declared.

REFERENCES

1. Johnson, K.A. (2010) The kinetic and chemical mechanism of high-fidelity DNA polymerases. *Biochim. Biophys. Acta*, **1804**, 1041–1048.

2. Sawaya, M.R., Prasad, R., Wilson, S.H., Kraut, J. and Pelletier, H. (1997) Crystal structures of human DNA polymerase beta complexed with gapped and nicked DNA: evidence for an induced fit mechanism. *Biochemistry*, **36**, 11205–11215.
3. Li, Y., Kong, Y., Korolev, S. and Waksman, G. (1998) Crystal structures of the Klenow fragment of *Thermus aquaticus* DNA polymerase I complexed with deoxyribonucleoside triphosphates. *Protein Sci.*, **7**, 1116–1123.
4. Doublet, S., Sawaya, M.R. and Ellenberger, T. (1999) An open and closed case for all polymerases. *Structure*, **7**, R31–R35.
5. Holm, L. and Sander, C. (1995) DNA polymerase beta belongs to an ancient nucleotidyltransferase superfamily. *Trends Biochem. Sci.*, **20**, 345–347.
6. Brautigam, C.A. and Steitz, T.A. (1998) Structural and functional insights provided by crystal structures of DNA polymerases and their substrate complexes. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **8**, 54–63.
7. Pelletier, H., Sawaya, M.R., Kumar, A., Wilson, S.H. and Kraut, J. (1994) Structures of ternary complexes of rat DNA polymerase beta, a DNA template-primer, and ddCTP. *Science*, **264**, 1891–1903.
8. Beard, W.A. and Wilson, S.H. (1998) Structural insights into DNA polymerase beta fidelity: hold tight if you want it right. *Chem. Biol.*, **5**, R7–R13.
9. Kunkel, T.A. and Bebenek, K. (2000) DNA replication fidelity. *Annu. Rev. Biochem.*, **69**, 497–529.
10. Beard, W.A., Shock, D.D. and Wilson, S.H. (2004) Influence of DNA structure on DNA polymerase beta active site function: extension of mutagenic DNA intermediates. *J. Biol. Chem.*, **279**, 31921–31929.
11. Garcia-Diaz, M., Bebenek, K., Krahn, J.M., Kunkel, T.A. and Pedersen, L.C. (2005) A closed conformation for the Pol lambda catalytic cycle. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **12**, 97–98.
12. Foley, M.C., Arora, K. and Schlick, T. (2006) Sequential side-chain residue motions transform the binary into the ternary state of DNA polymerase lambda. *Biophys. J.*, **91**, 3182–3195.
13. Moon, A.F., Garcia-Diaz, M., Bebenek, K., Davis, B.J., Zhong, X., Ramsden, D.A., Kunkel, T.A. and Pedersen, L.C. (2007) Structural insight into the substrate specificity of DNA Polymerase mu. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **14**, 45–53.
14. Li, Y. and Schlick, T. (2010) Modeling DNA polymerase mu motions: subtle transitions before chemistry. *Biophys. J.*, **99**, 3463–3472.
15. Ruiz, J.F., Dominguez, O., Lain de Lera, T., Garcia-Diaz, M., Bernad, A. and Blanco, L. (2001) DNA polymerase mu, a candidate hypermutase? *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **356**, 99–109.
16. Garcia-Diaz, M., Bebenek, K., Krahn, J.M., Blanco, L., Kunkel, T.A. and Pedersen, L.C. (2004) A structural solution for the DNA polymerase lambda-dependent repair of DNA gaps with minimal homology. *Mol. Cell*, **13**, 561–572.
17. Garcia-Diaz, M., Bebenek, K., Gao, G., Pedersen, L.C., London, R.E. and Kunkel, T.A. (2005) Structure-function studies of DNA polymerase lambda. *DNA Repair (Amst)*, **4**, 1358–1367.
18. Martin, M.J., Juarez, R. and Blanco, L. (2012) DNA-binding determinants promoting NHEJ by human Polmu. *Nucleic Acids Res.*, **40**, 11389–11403.
19. Brissett, N.C., Pitcher, R.S., Juarez, R., Picher, A.J., Green, A.J., Dafforn, T.R., Fox, G.C., Blanco, L. and Doherty, A.J. (2007) Structure of a NHEJ polymerase-mediated DNA synaptic complex. *Science*, **318**, 456–459.
20. Nick McElhinny, S.A., Havener, J.M., Garcia-Diaz, M., Juarez, R., Bebenek, K., Kee, B.L., Blanco, L., Kunkel, T.A. and Ramsden, D.A. (2005) A gradient of template dependence defines distinct biological roles for family X polymerases in nonhomologous end joining. *Mol. Cell*, **19**, 357–366.
21. Garcia-Diaz, M., Bebenek, K., Sabariego, R., Dominguez, O., Rodriguez, J., Kirchhoff, T., Garcia-Palomero, E., Picher, A.J., Juarez, R., Ruiz, J.F. et al. (2002) DNA polymerase lambda, a novel DNA repair enzyme in human cells. *J. Biol. Chem.*, **277**, 13184–13191.
22. Garcia-Diaz, M., Bebenek, K., Larrea, A.A., Havener, J.M., Perera, L., Krahn, J.M., Pedersen, L.C., Ramsden, D.A. and Kunkel, T.A. (2009) Template strand scrunching during DNA gap repair synthesis by human polymerase lambda. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **16**, 967–972.
23. Thode, S., Schafer, A., Pfeiffer, P. and Vielmetter, W. (1990) A novel pathway of DNA end-to-end joining. *Cell*, **60**, 921–928.
24. Roth, D.B. and Wilson, J.H. (1986) Nonhomologous recombination in mammalian cells: role for short sequence homologies in the joining reaction. *Mol. Cell. Biol.*, **6**, 4295–4304.
25. Kramer, K.M., Brock, J.A., Bloom, K., Moore, J.K. and Haber, J.E. (1994) Two different types of double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae* are repaired by similar RAD52-independent, nonhomologous recombination events. *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 1293–1301.
26. Ramsden, D.A. (2011) Polymerases in nonhomologous end joining: building a bridge over broken chromosomes. *Antioxid. Redox Signal.*, **14**, 2509–2519.
27. Mueller, G.A., Moon, A.F., Derose, E.F., Havener, J.M., Ramsden, D.A., Pedersen, L.C. and London, R.E. (2008) A comparison of BRCT domains involved in nonhomologous end-joining: introducing the solution structure of the BRCT domain of polymerase lambda. *DNA Repair (Amst)*, **7**, 1340–1351.
28. Matsumoto, T., Go, K., Hyodo, M., Koiwai, K., Maezawa, S., Hayano, T., Suzuki, M. and Koiwai, O. (2012) BRCT domain of DNA polymerase mu has DNA-binding activity and promotes the DNA polymerization activity. *Genes Cells*, **17**, 790–806.
29. Martin, M.J., Juarez, R. and Blanco, L. (2012) DNA-binding determinants promoting NHEJ by human Polmu. *Nucleic Acids Res.*, **40**, 11389–11403.
30. Fan, W. and Wu, X. (2004) DNA polymerase lambda can elongate on DNA substrates mimicking non-homologous end joining and interact with XRCC4-ligase IV complex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **323**, 1328–1333.
31. Fiala, K.A., Duym, W.W., Zhang, J. and Suo, Z. (2006) Up-regulation of the fidelity of human DNA polymerase lambda by its non-enzymatic proline-rich domain. *J. Biol. Chem.*, **281**, 19038–19044.
32. Prasad, R., Beard, W.A., Strauss, P.R. and Wilson, S.H. (1998) Human DNA polymerase beta deoxyribose phosphate lyase. Substrate specificity and catalytic mechanism. *J. Biol. Chem.*, **273**, 15263–15270.
33. Garcia-Diaz, M., Bebenek, K., Kunkel, T.A. and Blanco, L. (2001) Identification of an intrinsic 5'-deoxyribose-5-phosphate lyase activity in human DNA polymerase lambda: a possible role in base excision repair. *J. Biol. Chem.*, **276**, 34659–34663.
34. Brissett, N.C., Martin, M.J., Pitcher, R.S., Bianchi, J., Juarez, R., Green, A.J., Fox, G.C., Blanco, L. and Doherty, A.J. (2011) Structure of a preternary complex involving a prokaryotic NHEJ DNA polymerase. *Mol. Cell*, **41**, 221–231.
35. Boule, J.B., Rougeon, F. and Papanicolaou, C. (2001) Terminal deoxynucleotidyl transferase indiscriminately incorporates ribonucleotides and deoxyribonucleotides. *J. Biol. Chem.*, **276**, 31388–31393.
36. Nick McElhinny, S.A. and Ramsden, D.A. (2003) Polymerase mu is a DNA-directed DNA/RNA polymerase. *Mol. Cell. Biol.*, **23**, 2309–2315.
37. Ruiz, J.F., Juarez, R., Garcia-Diaz, M., Terrados, G., Picher, A.J., Gonzalez-Barrera, S., Fernandez de Henestrosa, A.R. and Blanco, L. (2003) Lack of sugar discrimination by human Pol mu requires a single glycine residue. *Nucleic Acids Res.*, **31**, 4441–4449.
38. Martin, M.J., Garcia-Ortiz, M.V., Esteban, V. and Blanco, L. (2013) Ribonucleotides and manganese ions improve non-homologous end joining by human Polmu. *Nucleic Acids Res.*, **41**, 2428–2436.
39. Shevelev, I., Blanca, G., Villani, G., Ramadan, K., Spadari, S., Hubscher, U. and Maga, G. (2003) Mutagenesis of human DNA polymerase lambda: essential roles of Tyr505 and Phe506 for both DNA polymerase and terminal transferase activities. *Nucleic Acids Res.*, **31**, 6916–6925.
40. Matsuoka, S., Ballif, B.A., Smogorzewska, A., McDonald, E.R. 3rd, Hurov, K.E., Luo, J., Bakalarski, C.E., Zhao, Z., Solimini, N., Lerenthal, Y. et al. (2007) ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science*, **316**, 1160–1166.